

**Nachweis und Charakterisierung
einer RNA Polymerase-stimulierenden
und einer DNA-bindenden Aktivität
aus *Nicotiana tabacum***

Raphael Konrad Bösl

Disbui. München

1989



**Nachweis und Charakterisierung
einer RNA Polymerase-stimulierenden und einer DNA-bindenden Aktivität
aus *Nicotiana tabacum***

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Raphael Konrad Bösl
München
1989

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12.3 der Promotionsordnung vom
5. März 1981 von Prof. Dr. G. R. Hartmann betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, daß die Dissertation von mir selbständig,
ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt ist.

München, den 05.06.1989

Raphael Bösl

Dissertation eingereicht am: 05.06.1989

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. R. Hartmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.1989

Meiner Frau

*Willst Du Dich im Ganzen erquicken,
so mußt Du das Ganze im Kleinen erblicken.*

J.-W. von Goethe

Inhaltsverzeichnis

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1986 bis Mai 1989 auf Anregung und unter Anleitung von Prof. Dr. G. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Biochemischen Instituts für Ihre Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Diskussionen.

Besonders danken möchte ich

der Hanns-Seidel-Stiftung für die ideelle und finanzielle Förderung während meiner Dissertation in der Form eines Graduiertenstipendiums,

H. Sommer, Köln für das Plasmid pAm3,

Prof. Dr. M. Zenk, München und seinen Mitarbeitern für die Benutzung des Pflanzenzellkulturlabors und für die gute Zusammenarbeit bei den Untersuchungen der Benzo[*a*]phenanthridine,

ferner

K. Merkel für die Pflege der Tabakzellkulturen und für die *E. coli* RNA Polymerase,

I. Ortner + für die RNA Polymerase B(II) aus Kalbsthymus,

H. Sieber für die Anreicherung der RNA Polymerase B(II) aus Weizenkeimen, und für das Anfertigen der Filmnegative,

M. Thomm, Regensburg für die *M. vanniellii* RNA Polymerase.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Figuren und Tabellen	X
Zusammenfassung	1
Einleitung	4
Material und Methoden	
<i>Material</i>	
Bakterien und Pflanzenmaterial	9
Enzyme und Proteine	9
Nukleotide und Nukleinsäuren	11
Material für die Chromatographie	12
Material für die Gelelektrophorese	13
Sonstige Chemikalien	13
Autoradiographie und Photographie	14
Geräte und sonstige Materialien	14
<i>Methoden</i>	
Bakterienzüchtung	
Züchtung in Flüssigkultur	15
Züchtung auf Agarplatten	16
Herstellung transformationskompetenter Bakterien	17
Transformation von Bakterien	17
Aufbewahrung von Bakterien	18

Isolierung von DNA	
Plasmidanreicherung über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	18
Plasmidanreicherung über HPLC	19
Alkalischer Schnellaufschluß zur Plasmidisolierung	20
Isolierung von DNA aus Agarosegelen	
Isolierung über DEAE-Cellulose-Membranfilter	20
Isolierung über Elektroelution	21
Fällung von DNA und RNA	22
Enzymatische Reaktionen an DNA	
Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	22
Hydrolyse von 5'-Phosphatresten mit alkalischer Phosphatase	23
[³² P]-Markierung mit Polynukleotid-Kinase	23
Auffüllen von überstehenden Enden und [³² P]-Markierung mit Klenow-Polymerase	24
Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase	25
Elektrophoretische Verfahren	
Agarosegelelektrophorese	26
Polyacrylamidgelelektrophorese	27
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	27
Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese	28
Tabakzellkultur	
Suspensionskultur	29
Callus-Kultur	31
Aufschluß von Tabakzellen	
Aufschluß durch enzymatische Hydrolyse	31
Aufschluß im tiefgefrorenen Zustand	32
Isolierung von Tabakzellkernen	33
Extraktion von Tabakzellkernen	
Extraktion intakter Zellkerne	37
Extraktion aufgebrochener Zellkerne	38
Reinigung von Zellkernextrakten	
Chromatographie an DEAE-Sephrose	40
Ammoniumsulfatfällung	40
Lagerung von Kernextraktproteinen	41
Dialyse von Proteinen	41

Konzentrationsbestimmung von Proteinen	
Qualitative Bestimmung	42
Quantitative Bestimmung	42
Standardtranskriptionsansatz	43
Nachweis von Protein-DNA-Bindung	
Bindung an Nitrocellulose	46
Gelretention	47

Ergebnisse

<i>Entdeckung einer RNA Polymerase-stimulierenden und einer DNA-bindenden Aktivität</i>	48
---	----

Störende Aktivitäten im Kernextrakt

Proteasen	50
DNasen	52
RNasen	55

Anreicherung der stimulierenden Aktivität

Bestimmung der stimulierenden Aktivität	58
---	----

Herstellung des Kernextrakts	
Extraktion intakter Zellkerne	60
Extraktion aufgebrochender Zellkerne	62

Chromatographie an DEAE-Sephrose	65
----------------------------------	----

Proteinfraktionierung mit Ammoniumsulfat	68
--	----

Chromatographie an Kationenaustauscher	
Heparinsepharose	71
Phosphocellulose	74

Chemische Natur der stimulierenden Aktivität

Nachweis des Proteincharakters	
Hitzeinaktivierung	77
Proteasesensitivität	79

Molmassenbestimmung	81
---------------------	----



Charakterisierung der stimulierenden Aktivität

Abhängigkeit von der Proteinkonzentration	86
Abhängigkeit von der Polymerase-Konzentration	88
Abhängigkeit von der DNA-Konzentration	90
Abhängigkeit von der Salzkonzentration	92
Analyse der Transkriptionsprodukte	95
Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit	98
Simulation der stimulierenden Aktivität durch DNasen	100
Prüfung auf <i>nicking</i> -Aktivität	103
Prüfung auf Bildung eines Präinitiationskomplexes	107
Stimulierung der Dinukleotidsynthese	110
Einfluß von rRNA	111
Simulation der stimulierenden Aktivität durch RNase	114
Säurestabilität	116
Selektive Stimulierung an Chalconsynthase-Genfragmenten	118
Wirkung auf verschiedene RNA Polymerasen	120

Untersuchungen zur Protein-DNA-Komplexbildung mit RNA Polymerase II

Einfluß zweiwertiger Metallionen auf die Bindung von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen an DNA-Fragmente	122
Einfluß von Kernextrakt auf die Bindung von RNA Polymerase II an DNA-Fragmente	125
Analyse von Protein-DNA-Bindungen durch Exonuklease III	134

Diskussion	143
-------------------	-----

Anhang

Einfluß antimikrobieller Agentien auf die RNA Polymerase-Aktivität

Macarpin, Chelirubin und Sanguinarin 162

Daunomycin 169

Thiolutin 172

Literatur 175

Abkürzungen 184

Verzeichnis der Figuren und Tabellen

Fig. 1	Gelelektrophoretische Analyse des Tests auf Proteasen im Kernextrakt mit Aldolase	51
Fig. 2	Gelelektrophoretische Analyse des Tests auf DNasen im Kernextrakt mit pUC 18 Plasmid-DNA	53
Fig. 3	Gelelektrophoretische Analyse des Tests auf RNasen im Kernextrakt mit 16 und 23 S rRNA	56
Fig. 4	Phasenkontrastaufnahme hochgereinigter Zellkerne aus <i>N. tabacum</i>	60
Fig. 5	Chromatographie von Kernextrakt an DEAE-Sepharose	66
Fig. 6	Nachweis der stimulierenden Aktivität im 0,05 M NaCl Eluat einer DEAE-Sepharose Chromatographie	67
Fig. 7	Übersichtsdiagramm zur Anreicherung der stimulierenden Aktivität	76
Fig. 8	Nachweis des Proteincharakters durch Hitzeinaktivierung	78
Fig. 9A	Gelfiltration von stimulierender Aktivität und Eichproteinen an Sephadex G50	84
Fig. 9B	Halb-logarithmisches Diagramm der Elutionsmaxima der Gelfiltration	85
Fig. 10	Abhängigkeit des Stimulierungsfaktors von der Proteinkonzentration	87
Fig. 11	Abhängigkeit der stimulierenden Aktivität von der RNA Polymerasekonzentration	89
Fig. 12	Abhängigkeit der stimulierenden Aktivität von der DNA-Konzentration	91
Fig. 13	Abhängigkeit des Stimulierungsfaktors von der Salzkonzentration	94
Fig. 14	Gelelektrophoretische Analyse der Transkriptionsprodukte von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen in Abhängigkeit von der stimulierenden Aktivität	96
Fig. 15	Abhängigkeit des Stimulierungsfaktors von der Vorinkubationszeit	99

Fig. 16	Gelelektrophoretische Analyse der Transkriptionsprodukte von RNA Polymerase aus Weizenkeimen in Abhängigkeit von DNase I, RNase A, RNase T ₁ und fraktioniertem Kernextrakt	102
Fig. 17	Gelelektrophoretische Analyse des Tests auf <i>nicking</i> -Aktivität	105
Fig. 18	Zeitabhängigkeit der stimulierenden Aktivität bei 30 °C	108
Fig. 19	Einfluß von 16S & 23S rRNA auf die RNA Polymerase Aktivität und auf die stimulierende Aktivität	113
Fig. 20	Vergleich des Stimulierungsfaktors an verschiedenen DNA-Fragmenten des Chalconsynthasegens	119
Fig. 21	Gelretentionstest von RNA Polymerase II in Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen	124
Fig. 22	Gelretentionstest mit RNA Polymerase II und fraktioniertem Kernextrakt	129
Fig. 23	Gelretention von Protein-DNA-Komplexen mit Kompetitor-DNA	132
Fig. 24	Hydrolyse des 746 bp langen DNA-Fragments durch Exonuklease III in Abhängigkeit von RNA Polymerase und fraktioniertem Kernextrakt	136
Fig. 25	Sequenzausschnitt aus dem 746 bp langen DNA-Fragment des Chalconsynthasegens	157
Fig. 26	Sequenzausschnitt aus dem Nopalinsynthasegen	158
Fig. 27	Inhibierung von RNA Polymerase aus Weizenkeimen und aus <i>E. coli</i> mit Macarpin	164
Fig. 28	Struktur von Benzo[<i>c</i>]phenanthridin Alkaloide	167
Fig. 29	Elektrophoretische Entfärbung von Benzo[<i>c</i>]phenanthridin-DNA-Komplexen	168
Fig. 30	Struktur von Daunomycin	169
Fig. 31	Inhibierung von RNA Polymerase aus Weizenkeimen und aus <i>E. coli</i> mit Daunomycin	171
Fig. 32	Struktur von Thiolutin	172

Tab. 1	Einfluß von Vanadylribonukleosid-Komplexen auf die RNA Polymerase-Aktivität von Weizenkeimen	57
Tab. 2a	Nachweis von RNA Polymerase Aktivität im Kernextrakt	61
Tab. 2b	Nachweis von Protein-DNA-Bindeaktivität im Kernextrakt	62
Tab. 3	Vergleich von fraktionierten Kernextrakten aus intakten und aus aufgebrochenen Zellkernen	64
Tab. 4	Nachweis von Protein-DNA-Bindeaktivität im fraktionierten Kernextrakt	68
Tab. 5	Zusammenfassung der Anreicherung der stimulierenden Aktivität über DEAE-Sepharsechromatographie und mit Ammoniumsulfatfraktionierung	70
Tab. 6	Zusammenfassung der Anreicherung der stimulierenden Aktivität über DEAE- und Heparin-Sepharsechromatographie	73
Tab. 7	Stimulierung von RNA Polymerase durch Eluate der Phosphocellulose-Chromatographie	75
Tab. 8	Nachweis des Proteincharakters durch Proteasesensitivität	80
Tab. 9	Ultrafiltration mit Centricon Mikrokonzentratoren	82
Tab. 10	Einfluß der stimulierenden Aktivität auf die Dinukleotidsynthese	111
Tab. 11	Säurestabilität der stimulierenden Aktivität	117
Tab. 12	Stimulierung von RNA Polymerase an einem eubakteriellen Plasmid-DNA-Fragment	118
Tab. 13	Vergleich des Stimulierungsfaktors an verschiedenen RNA Polymerasen	121
Tab. 14	Bindung von RNA Polymerase und Kernextrakt an DNA-Fragmente	127
Tab. 15	Längenbestimmung ausgewählter DNA-Banden der Exonuklease III Schutzexperimente	142
Tab. 16	Vergleich der repetitiven Sequenzen mit dem "enhancer core" Motiv	159
Tab. 17	Inhibierung von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen mit Macarpin, Chelirubin und Sanguinarin	166
Tab. 18	Inhibierung von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen mit Thiolutin	174

Zusammenfassung

Eine RNA Polymerase-stimulierende und eine DNA-bindende Aktivität wurde in teilweise gereinigten Zellkernextrakten aus *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*) nachgewiesen. Die stimulierende Aktivität erhöht in einem *in vitro* Transkriptionsansatz die Gesamt-RNA Synthese von RNA Polymerase aus *N. tabacum*, Weizenkeimen, Kalbsthymus und *Methanococcus vannielii* (*M. vannielii*) zwei- bis elffach. Die Aktivität von *Escherichia coli* (*E. coli*) RNA Polymerase wird hingegen um 40% inhibiert.

Untersuchungen über die Abhängigkeit der Stimulierung der Aktivität der RNA Polymerase B (II) aus Weizenkeimen von der DNA-Matrize führen zur Entdeckung einer bevorzugten Stimulierung an einem Promotorfragment des Chalconsynthasegens aus *Antirrhinum majus* (*A. majus*) mit den Sequenzen von -111 bis -354 relativ zum Transkriptionsstartpunkt.

Untersuchungen über den Mechanismus der Stimulierung von RNA Polymerase B (II) aus Weizenkeimen ergaben in einer abortiven Initiationsreaktion unter "steady state" Bedingungen eine ca. dreifache Stimulierung der Dinukleotidsynthese. Dieses Ergebnis bedeutet eine Stimulierung der Initiationsreaktion der Transkription.

Untersuchungen über die Salzabhängigkeit ergaben, daß bei einer NaCl-Konzentration größer als 50 mM eine Stimulierung von RNA Polymerase B (II) aus Weizenkeimen durch fraktionierten Kernextrakt nicht mehr nachweisbar ist. Die RNA Polymerase Aktivität bleibt zwischen 20 und 50 mM NaCl im Ansatz unverändert. Dieses Ergebnis deutet auf schwache elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der stimulierenden Aktivität und der RNA Polymerase bzw. der DNA-Matrize hin.

Untersuchungen zur chemischen Natur führten zu dem Ergebnis, daß die stimulierende Aktivität durch Hitze inaktivierbar und proteasesensitiv ist. Eine relative Molmassenbestimmung durch Gelfiltration an Sephadex G50 erbrachte eine Molmasse von ca. 10.000. Diese Ergebnisse bedeuten, daß die stimulierende Aktivität einen oder mehreren relativ kleinen Proteinen im Kernextrakt zugeordnet werden kann.

Untersuchungen über den Einfluß zweiwertiger Metallionen auf die Bindung von RNA Polymerase B (II) aus Weizenkeimen an DNA-Fragmente führten in einem Gelretentionstest zu dem Ergebnis, daß zusätzliches Zink die Intensität einer retardierten Protein-DNA-Bande erhöht. Magnesium und Mangan erhöhen die Intensität dieser Bande nicht wesentlich. Dieses Ergebnis zeigt, daß ausschließlich Zink die Bindungsaffinität von RNA Polymerase an die DNA-Matrize erhöht.

Nitrocellulose-Bindungstests und Gelretentionsanalysen führten zu der Entdeckung von einem oder mehreren DNA-bindenden Proteinen im fraktionierten Kernextrakt, welche die Bindungsaffinität von RNA-Polymerase B(II) aus Weizenkeimen spezifisch an ein Promotorfragment des Chalconsynthasegens erhöhen. Dieses DNA-Fragment enthält die Sequenzen von -333 bis -1100 relativ zum Transkriptionsstartpunkt und ist somit verschieden von dem DNA-Fragment, an dem bevorzugt eine Stimulierung von RNA Polymerase B (II) aus Weizenkeimen durch denselben fraktionierten Kernextrakt erfolgt.

Exonuklease III Schutzexperimente führten zu dem Ergebnis, daß RNA Polymerase B (II) aus Weizenkeimen in Verbindung mit fraktioniertem Kernextrakt spezifisch repetitive Sequenzen des Chalconsynthasegens in einem Bereich von -977 bis -1087 verstärkt vor Hydrolyse schützt. Ein Vergleich der Größe und der Größenunterschiede der geschützten DNA-Fragmente führt zu der Entdeckung von bisher unbekannten repetitiven DNA-Sequenzen der Form: - TCTTT - 33 - TCTTT - 31 - TTTCT - 27 - TTTCT -, welche mit einer enhancerähnlichen Funktion in Verbindung gebracht werden.

*"Initiation of transcription
represents a major step toward
expressing a gene" (Lewin, 1985)*

Einleitung

In einer eukaryotischen Zelle wird die Expression proteinkodierender Gene (Klasse II Gene) auf mehreren Ebenen kontrolliert. Ein wichtiger Kontrollschritt ist dabei die Transkription durch eine DNA-abhängige RNA Polymerase (EC 2.7.7.6). Die Transkription wird in drei kontinuierlich ineinander übergehende Schritte, Initiation, Elongation und Termination aufgeteilt (Chambon, 1974). Die Initiation als ein erster und wichtiger Schritt der Transkription wird auf zwei Ebenen kontrolliert: zum einen wird die Häufigkeit der Startreaktion reguliert und zum anderen wird die Startstelle auf der DNA-Matrize festgelegt (Serfling et al., 1985).

Im Gegensatz zu *E. coli* RNA Polymerase Holoenzym können eukaryotische RNA Polymerasen allein *in vitro* keine Startstellen auf der DNA-Matrize spezifisch und zugleich mit hoher Häufigkeit erkennen (Cooke et al., 1984). So besitzt RNA Polymerase B (II) aus Weizenkeimen in der primer-unabhängigen Dinukleotidsynthese eine ca. 10^6 fach geringere Aktivität als *E. coli* RNA Polymerase (Bösl, 1986).

Jedoch konnte mit RNA Polymerase II aus menschlichen KB Zellen bereits gezeigt werden, daß verschiedene Hilfsproteine (Transkriptionsfaktoren) für eine aktive und selektive Initiation der Transkription notwendig sind (Matsui et al., 1980). In Abwesenheit dieser Transkriptionsfaktoren synthetisiert die RNA Polymerase nur mit geringer Effizienz RNA-Ketten definierter Länge.

Einige der Komponenten, die zur Ausbildung eines aktiven Transkriptionskomplexes in pflanzlichen und tierischen Zellen führen, sind ähnlich. So zeigt RNA Polymerase II aus Weizenkeimen ähnliche strukturelle und enzymatische Eigenschaften wie Säuger RNA Polymerase (Dyan & Burgess, 1979). Die Promotorsequenzen von pflanzlichen und tierischen Zellen sind konserviert (Bucher & Trifonov, 1986) und sogar der Mechanismus verschiedener RNA Polymerase stimulierender Faktoren scheint ähnlich zu sein (Ptashne, 1988). So stimuliert ein Aktivatorprotein aus Hefe (GAL 4) die Genexpression nicht nur in Hefe, sondern auch in Säuger-, Insekten- und Pflanzenzellen. In *E. coli* ist der Hefeaktivator jedoch nicht aktiv (Ptashne, 1988).

Bei der Rekonstitution eines Transkriptionskomplexes konnten Flynn et al. (1987) zeigen, daß einzelne chromatographische Fraktionen von Kernextrakten aus Weizenkeimen teilweise oder vollständig einzelne chromatographisch fraktionierte Komponenten eines *in vitro* HeLa-Zell Transkriptionssystems ersetzen. Ein Vergleich mit dem reinen HeLa-System ergibt jedoch, daß die spezifische *in vitro* Transkription des rekonstituierten Weizenkeim

Transkriptionssystem an dem "adenovirus major late promoter" (Ad2 MLP) als DNA-Matrize eine sehr geringe Effizienz besitzt. Erst nach einer 14tägigen Exposition des Röntgenfilms wird eine schwache und diffuse Bande in der Region des erwarteten Abbruchtranskriptes beobachtet. Im Gegensatz dazu ist mit dem HeLa-Zell Transkriptionssystem bereits nach einer 16stündigen Exposition eine deutliche und breite Bande zu erkennen. Die geringe Transkriptionseffizienz des Weizenkeimsystems konnte durch Zugabe anderer chromatographischer Fraktionen des Weizenkeim Kernextrakts auch nicht erhöht werden. Flynn et al. (1987) vermuten, daß in den Kernextrakten stimulierende Faktoren fehlen, da Weizenkeime kein aktiv teilendes Gewebe darstellen. Hingegen fanden Rizzo et al. (1978) eine Nicht-Histon Chromatinfraction aus Sojabohnenblättern, welche RNA Polymerase stimuliert. Diese stimulierende Aktivität stimuliert jedoch nicht nur RNA Polymerase II aus Sojabohnen, sondern auch *E. coli* RNA Polymerase zwei- bis dreifach unspezifisch an chromosomaler DNA aus Kalbsthymus oder Sojabohnen.

Für die Rekonstitution eines rein pflanzlichen und effektiven *in vitro* Transkriptionssystems müßte man nach dem Gesagten einen oder mehrere stimulierende Proteinfaktoren aus aktiv wachsenden Pflanzenzellen isolieren, welche möglichst nur pflanzliche RNA Polymerasen stimulieren. Ferner sollten diese Faktoren in der Lage sein, pflanzliche RNA Polymerasen selektiv an bestimmten Promotorbereichen eines pflanzlichen Gens zu stimulieren. Die Verfügbarkeit von Weizenkeim RNA Polymerase B (II) und einer aktiv wachsenden Zellkultur aus *N. tabacum* legten es nahe, solche Faktoren in Zellkernextrakten nachzuweisen.

Die effektive und korrekte Initiation der Transkription proteinkodierender Gene auf dem Genom von Animalviren, Hefe und Tieren durch eukaryotische RNA Polymerase II wird durch *cis*-wirkende DNA-Sequenzen, sogenannte Promotoren und Enhancern, reguliert (Sassone-Corsi & Borrelli, 1986). Die Regulation erfolgt durch das Binden *trans*-wirkender Proteinfaktoren an *cis*-wirkende regulatorische Sequenzen der DNA. So bindet der sogenannte CCAAT-bindende Transkriptionsfaktor (CTF) aus HeLa-Zellen an die GCCAAT Erkennungssequenz, einem wichtigen konservierten RNA Polymerase II Promotorelement (Santoro et al., 1988), und stimuliert die promotorspezifische Transkription bis zum zehnfachen der ursprünglichen Aktivität (Short, 1987). Solche Proteinfaktoren binden spezifisch und mit verhältnismäßig hoher Affinität an *cis*-wirkenden Sequenzen der DNA (Santoro et al., 1988).

Somit lag es nahe, auch in einem rein pflanzlichen System spezifische Protein-DNA Wechselwirkungen zwischen RNA Polymerase II, einer Proteinfraktion aus pflanzlichen Kernextrakten und spezifischen regulatorischen pflanzlichen DNA-Sequenzen zu identifizieren. In den zu besprechenden Versuchen wird als DNA das von Sommer, Köln (Sommer und Saedler, 1986) zur Verfügung gestellte Chalconsynthasegen aus *A. majus* verwendet. Die Chalconsynthase ist ein Schlüsselenzym in der Flavonoidbiosynthese. Die Transkription des dazugehörigen Gens ist *in vivo* hochreguliert und enthält zahlreiche regulatorische Sequenzen, wie z. B. eine homologe CCAAT-Sequenz und mehrere repetitive Sequenzen (Sommer & Saedler, 1986), die das Erkennen von spezifischen Protein-DNA-Bindungen wahrschein-

lich machen. Zur Identifizierung solcher regulatorischer proteinbindender DNA-Sequenzen wurden bereits im tierischen System Nitrocellulose-Bindungs- tests, Gelretentionstests und Exonuklease II Schutzexperimente mit Erfolg angewendet und sollen auch in einem pflanzlichen System anwendbar sein.

Die vorliegende Arbeit berichtet von der Herstellung eines Tabakzellkern- extrakts und von der Fraktionierung der Zellkernproteine. In den fraktio- nierten Zellkernextrakten konnte eine stimulierende Aktivität identifiziert und charakterisiert werden, welche mehrere eukaryotische RNA Polymerasen und eine archaebakterielle RNA Polymerase zwei- bis elffach stimuliert. *E. coli* RNA Polymerase wird hingegen nicht stimuliert. Die Stimulierung von Weizenkeim RNA Polymerase erfolgt verhältnismäßig selektiv an einem bestimmten Promotorfragment des Chalconsynthasegens. Ferner wurden auf dem Chalconsynthasegen bis heute unbekannte repetitive Sequenzen identifiziert, an denen RNA Polymerase II aus Weizenkeimen in Verbindung mit einem oder mehreren Kernproteinfaktoren verstärkt bindet. Diese Ergebnisse sind in einem aus höheren Pflanzen gewonnenem Transkrip- tionssystem die ersten Beispiele für eine spezifische Wirkung von Kernex- traktproteinen auf die Transkriptionsaktivität von RNA Polymerase II und für eine direkte Wirkung auf die Bindungsaffinität von RNA Polymerase II an spezifische repetitive DNA-Sequenzen.

Material und Methoden

Material

BAKTERIEN UND PFLANZENMATERIAL

E. coli Stamm JM83 (Arbeitskreis Prof. Dr. G. Hartmann)

Suspensionskultur von *N. tabacum* var. *White Burley*:

habituerte Wildtyp Zelllinie (L. Willmitzer und H. Steinbiß, Köln)

ENZYME UND PROTEINE

RNA Polymerasen (EC 2.7.7.6)

Weizenkeim RNA Polymerase B (II) wurde von Frau H. Sieber nach der Methode von Jendrisak und Burgess (1975) angereichert. Anstelle einer Fällung nach der DEAE-Cellulose Chromatographie wurde die Enzymlösung gegen TEDG-Puffer (0,05 M Tris-Cl (pH 7,9), 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 25% (v/v) Ethylenglykol; Jendrisak & Burgess, 1975) dialysiert.

Kalbsthymus RNA Polymerase B(II) wurde von Frau I. Ortner nach der Methode von Hinrichsen et al. (1985) angereichert.

E. coli RNA Polymerase wurde von Frau K. Merkel nach der Methode von Burgess und Jendrisak (1975) angereichert.

Methanococcus vannielii RNA Polymerase, angereichert von M. Thomm in Anlehnung an Thomm et al. (1986)

Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim bezogen. Nur die Restriktionsendonuklease *Hga* I wurde von New England Biolabs, Schwalbach bezogen.

Weitere Enzyme der Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

DNase I (RNase frei nach Maniatis et al. 1982)

Exonuklease III (EC 3.1.11.2)

Klenow-Enzym zur Sequenzierung (EC 2.7.7.7)

Lysozym (EC 3.2.1.17)

Phosphatase, alkalische (EC 3.1.3.1); Spezialqualität

Polynucleotid-Kinase (EC 2.7.1.78)

Proteinase K (EC 3.4.21.14)

RNase A (EC 3.1.27.5)

RNase T₁ (EC 3.1.27.3)

T4 DNA-Ligase (EC 6.5.1.1)

Cellulase und Pectinase (Serva, Heidelberg)

Eichproteine Aprotinin, Cytochrom c, Insulin Kette B (combithek Nr. 236 292)
Chymotrypsinogen A (combithek Nr. 104 558) der Fa. Boehringer Mannheim
GmbH, Mannheim

NUKLEOTIDE UND NUKLEINSAUREN

ATP, GTP, CTP, UTP (Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)

(α - 32 P)UTP (400 und 3000 Ci/mmol), (α - 32 P)dCTP (3000 Ci/mmol), (γ - 32 P)ATP
(5000 Ci/mmol) der Fa. Amersham Buchler, Braunschweig

Poly-desoxy-adenyl-thymidylsäure (polyd(A-T)-d(A-T), Boehringer Mannheim
GmbH, Mannheim)

Poly-desoxy-inosyl-cytidylsäure (polyd(I-C)-d(I-C), Pharmacia, Freiburg

16S & 23S rRNA (Nr. 206 938, Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)

pUC18-Vektor (Pharmacia, Freiburg)

Fragment d des Nopalinsynthasegens (beschrieben bei Schöffner, 1988)

pAm3 (beschrieben bei Sommer und Saedler, 1986)

pAm3/(AvaII): 1222 bp langes AvaII Restriktionsfragment von pAm3 nach
Auffüllen der überstehenden Enden in die SmaI Restriktions-
stelle des pUC 18-Vektors kloniert (siehe Methoden)

pAm3/746: 759 bp langes HincII Restriktionsfragment von pAm3/(AvaII) nach Auffüllen der überstehenden Enden in die SmaI Restriktionsstelle des pUC 18-Vektors kloniert (siehe Methoden).

pAm3/476: 490 bp langes HincII/EcoRI Restriktionsfragment von pAm3/(AvaII) nach Auffüllen der überstehenden Enden in die SmaI Restriktionsstelle des pUC 18-Vektors kloniert (siehe Methoden).

pAm3/350: Nach Hydrolyse von pAm3/476 mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII wurde das isolierte Restriktionsfragment mit den Chalconsynthasegensequenzen anschließend mit HinfI hydrolysiert. Das größere der beiden Fragmente wurde nach Auffüllen der überstehenden Enden in die SmaI Restriktionsstelle des pUC 18 Vektors kloniert (siehe Methoden).

MATERIAL FÜR DIE CHROMATOGRAPHIE

Biogel P6 (100-200 mesh; Bio-Rad, München)

DEAE-Sepharose CL6B, Heparin-Sepharose CL6B und Sephadex G50 (medium) von Pharmacia, Freiburg

Nucleogen DEAE-4000 HPLC-Säule (Diagen, Düsseldorf)

Phosphocellulose P11 (Whatman) und

Whatman 3MM-Chromatographiepapier bezogen über Hormuth & Vetter, Wiesloch

MATERIAL FÜR DIE GELELEKTROPHORESE

Acrylamid (2x krist.), N,N'-Methylenbisacrylamid, N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin (Serva, Heidelberg)

Agarose (Sigma Chemie, München)

Ethidiumbromid (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)

DEAE-Cellulose Membran (NA-45; Schleicher und Schüll GmbH, Dassel)

SONSTIGE CHEMIKALIEN

Albumin Fraktion V aus Rinderserum, α -Amanitin, Ampicillin, Chloramphenicol, Dithiothreitol, Hepes, Thiolutin (überlassen von Biochemica Werk Tutzing): Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Bacto-Yeast-Extrakt: Difco, Detroit, USA

Ammoniumacetat, Ammoniumnitrat, Ammoniumsulfat, Ammoniumperoxidisulfat, Borsäure (p.A.), Bromphenolblau, n-Butanol, Chloroform, Cobaltchlorid, EDTA, Eisensulfat, Ethanol, Formamid, Glycerin, Harnstoff,

Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumiodid, Kaliumnitrat, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Manganchlorid, Mangansulfat, Natriumchlorid, Natriumdo-decylsulfat, Natriummolybdat, Phenol, 2-Propanol, Saccharose, Zinksulfat:

Merck AG, Darmstadt

Percoll: Pharmacia, Freiburg

Cäsiumchlorid: Rühl Chemie, Friedrichshafen

Coomassie G250, 2-Mercaptoethanol, Phenylmethylsulfonylfluorid, Spermin·3HCl, Spermidin·3HCl, Triton X100: Serva, Heidelberg

Daunomycin, Mannitol, Mes, myo-Inositol, Nonidet P40, Thiamin, Tris:

Sigma Chemie, München

Macarpin, Chelirubin, Sanguinarin (isoliert von E. Liebing nach Liebing, 1988)

PPO, POPOP: Zinsser, Frankfurt

Alle Chemikalien waren vom besten käuflichen Reinheitsgrad

AUTORADIOGRAPHIE UND PHOTOGRAPHIE

Röntgenfilme Kodak X-OMAT AR und Fuji RX-100,

Verstärkerfolien Dupont Cronex Quanta IIB,

Entwickler Kodak D-19, Fixierer Agfa-Gevaert G334

Polaroidfilm T 107

GERÄTE UND SONSTIGE MATERIALIEN

Neben Standardlaborgeräten und -materialien wurden verwendet:

BIOTRAP Elektroelutionsapparatur (Schleicher & Schüll, Dassel)

Disk-Dialysekammer (Fa. Schütt)

Dialysefilter (Fa. Millipore)

Flüssigkeit-Szintillations-Zähler: Searle Analytic, Modell 6892

IBM Personalcomputer XT (IBM Deutschland GmbH) mit MicrogenieTM,

DNA-Sequenzprogramm (Beckman, München)

Mobicoll-Säulchen (mobitec GmbH, Göttingen)

Parr-Bombe (Semi-Micro Cell Disruption Chamber, Kontes, Vineland, NJ)

Ultra-Turrax T45 mit Messer 6G (Janke & Kunkel)

8300 Uvicord II und 7000 Ultrorac (LKB, Deutschland)

UV-Spektrophotometer: Spektralphotometer 260, Gilford Instrumente

Zentrifugen:

Ausschwingzentrifuge Cryofuge 6-6 (Heraeus Christ)

Ultrazentrifuge (Beckman L8-70 mit Rotor VT165)

WKF-Zentrifuge (G50k, WKF)

GENECLEAN-Kit (BIO 101, La Jolla, Californien, USA)

Miracloth (Hoechst, Frankfurt)

Nylon-Netze (100, 80, 20 μ m Porendurchmesser, Eckert & Cie AG, Waldkirch)

Nitrocellulose-Filter (BA-45; Schleicher und Schüll GmbH, Dassel)

Methoden

BAKTERIENZÜCHTUNG

Züchtung in Flüssigkultur

Zur Aufzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*) des Stammes JM 83 wurde nach Maniatis et al. (1982) als Nährstoffquelle steriles Luria-Broth (LB)-Medium (5 g Hefeextrakt, 10 g Bactotrypton, 5 g NaCl, pH 7,5 pro Liter) verwendet. Wurde ein mit einem pUC 18 Plasmid transformierter JM 83 Stamm verwendet, so wurde dem LB-Medium zusätzlich 50 μ g/ml Ampicillin

als Antibiotikum zugesetzt. Für die Plasmidisolierung wurden nach Animpfen von 500 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 6 - 10 ml einer Übernachtskultur die Bakterien unter Schütteln (115 Upm) bei 37 °C so lange inkubiert, bis die optische Dichte bei 550 nm einen Wert von 0,8 - 0,9 erreicht hatte. Zur Amplifizierung der Plasmid-DNA wurde der Kultur 170 µg/ml Chloramphenicol zugegeben und 15 - 16 Stunden bei 37 °C unter Schütteln weiterinkubiert. Nach Abkühlen auf ca. 10 °C wurden die Bakterien in einem Sorvall GS3-Rotor (7000 Upm, 20 min, 4 °C) zentrifugiert und geerntet. Zur Herstellung transformationskompetenter JM 83 Bakterien wurden 100 ml einer 100fach verdünnten Übernachtskultur bis zu einer optischen Dichte bei 660 nm von 0,3 - 0,4 gezüchtet ($1\frac{1}{2}$ - 2 Stunden) und durch Zentrifugation in einem Sorvall SS34-Rotor (7000 Upm, 5 Minuten, 4 °C) geerntet.

Züchtung auf Agarplatten

Zur Aufzucht von *E. coli* auf Agarplatten wurde steriles ca. 50 °C heißes LB-Medium mit 15 g/l Agar in sterile Petrischalen (Durchmesser 90 mm) gegossen und an der Luft getrocknet. Bei Bedarf wurde das Nährmedium mit der gleichen Antibiotikakonzentration versetzt wie bei der Flüssigkultur. Zur Aufzucht von *E. coli* aus einer Glycerinkultur wurden die Bakterien mit einer sterilen Impfföse auf den Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Zur Isolierung von Einzelkolonien wurden die Bakterien auf den Agarplatten mit einem Drigalskispatel ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet bis einzelne Kolonien sichtbar wurden.

HERSTELLUNG TRANSFORMATIONSKOMPETENTER BAKTERIEN

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli* vom Stamm JM83 erfolgte in Anlehnung an Maniatis (1982). Aus einer 100 ml Suspensionskultur geentete Bakterien (siehe Seite 15) wurden in 50 ml einer eiskalten Lösung von 10 mM Tris-Cl (pH 8,0) und 50 mM CaCl suspendiert und 20 Minuten in Eis inkubiert. Nach Zentrifugation in einem Sorvall SS34 Rotor (8000 Upm, 2 min, 4 °C) wurde der Bakterienniederschlag in 10 ml des gleichen CaCl₂-Tris-Puffer aufgenommen und in Eis 12 bis 24 Stunden bis zum Gebrauch aufbewahrt.

TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

Die Transformation von *E. coli* JM 83 Bakterien erfolgte wie bei Heinrich (1987) beschrieben. 50 - 70 ng (60 µl) DNA des Ligaseansatzes (siehe Seite 25) wurden zu 200 µl transformationskompetenter *E. coli* bei 0 °C gegeben und 40 Minuten in Eis belassen. Nach einem zweiminütigem Hitzeschock bei 42 °C und anschließendem Abkühlen auf Eis wurde 1 ml LB-Medium dazugegeben und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach einer Stunde wurden 200 µl der Bakteriensuspension auf einer Agaroseplatte mit 50 µg/ml Ampicillin als Antibiotikum und 50 µl einer 2%igen 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid ausgestrichen. Als Kontrolle wurden immer kompetente *E. coli* mit einem Aliquot des Ligaseansatzes von geschnittenem und dephos-

phoryliertem pUC 18 Vektor ohne DNA-Fragment transformiert. Die Transformationsrate von Plasmid-DNA, die "blunt end" mit DNA-Fragmenten ligiert war, lag bei $10^4 - 10^5$ Transformanten/ μg DNA.

AUFBEWAHRUNG VON BAKTERIEN

Die Bakterienstämme wurden zur Dauerkonservierung als Glycerinkulturen in 20% (v/v) sterilem Glycerin nach Schockgefrieren in einem Trockeneis-Isopropanol-Gemisch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Mehrere Monate lang konnten die Bakterien auch auf Agarplatten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

ISOLIERUNG VON DNA

Plasmidanreicherung über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Die Plasmidanreicherung wurde in Anlehnung an Humphreys et al. (1975) nach der Vorschrift von Brack (1983) durchgeführt. Nach Zentrifugation einer 1 l Suspensionskultur (siehe Seite 16) wurden die Bakterienniederschläge in insgesamt 12 ml 25%iger (w/v) Saccharose 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0) in Eis suspendiert. Nach Zugabe von 2 ml Lysozymlösung (10 mg Lysozym in 2 ml 0,25 M Tris-HCl (pH 8,0)) wurde die Bakteriensuspension mindestens

10 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt bis die Suspension viskos wurde. Durch Zugabe einer Spatelspitze Lysozym ließ sich die Hydrolyse der Bakterienmembranen beschleunigen. Anschließend wurden 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) hinzugegeben und die Suspension weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach Zugabe von 16 ml Triton-Lösung (0,2% Triton X-100, 0,06 M EDTA, 0,05 M Tris-Cl (pH 8,0)) wurde das Lysat im Sorvall SS34-Rotor (20.000 Upm, 70 Minuten, 4 °C) zentrifugiert. Der klare, DNA-enhaltene Überstand wurde vorsichtig dekantiert und mit 0,95 g/ml CsCl und 44 µl/ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. nach Zentrifugation in einem Beckman VTi65-Rotor (47.000 Upm, 18 Stunden, 18 °C oder 60.000 Upm, 4½ Stunden, 18 °C) wurde die Plasmid-DNA unter UV-Licht bei 366 nm mit einer 1 ml Plastikspritze isoliert. Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde die DNA-Lösung fünfmal mit Butanol ausgeschüttelt und zweimal gegen 3 l TE insgesamt ca. 6 Stunden dialysiert. Anschließend konnte die Plasmid-DNA mit 2 Volumen (v/v) Ethanol gefällt werden (siehe Seite 22).

Plasmidanreicherung über HPLC

Die Anreicherung von "supercoiled" Plasmid-DNA über eine HPLC-Säule Nucleogen DEAE-4000 erfolgte nach dem Handbuch der Fa. Diagen. Die HPLC-gereinigte pUC 18 Plasmid-DNA wurde in erster Linie als Vektor für die Ligation von DNA-Fragmenten verwendet.

Alkalischer Schnellaufschluß zur Plasmidisolierung

Zur Überprüfung transformierter *E. coli* auf Fremd-DNA wurden 2 ml einer Übernachtskultur zentrifugiert und die Plasmid-DNA durch alkalischen Schnellaufschluß wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben isoliert.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Isolierung über DEAE-Cellulose-Membranfilter

DNA-Fragmente wurden aus einem Agarosegel durch Binden an eine DEAE-Cellulosemembran nach Lizardi (1981) isoliert. DNA-Fragmente mit einer Größe von 100 - 1200 Basenpaaren wurden im Agarosegel gegen die eingesetzte DEAE-Membran (10-120×10 mm) bei 4 V/cm elektrophoretisiert. Die Membran wurde zuvor 10 Minuten lang mit 10 mM EDTA (pH 7,6), fünf Minuten lang mit 0,5 M NaOH und mehrmals mit deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur gewaschen und konnte danach bei 4 °C in Wasser aufbewahrt werden. Nachdem unter UV-Licht bei 366 nm kontrolliert worden war, ob die gesamte DNA an die Membran gewandert war, wurde die Membran aus dem Agarosegel entfernt und die Teile der Membran weggeschnitten, die keine DNA gebunden hatten. Dies erkannte man daran, daß die Membran keine Ethidiumbromid oder auch Bromphenolblaufärbung zeigte. Nach mehrmaligen kräftigen Abspritzen der Membran mit NET-Puffer (0,15 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 20 mM Tris-Cl (pH 8,0)) wurde sie in ein 500 µl

Plastikreaktionsgefäß überführt und mit 200 µl 1.0 M NaCl NET-Puffer 45 Minuten bei 68 °C bzw. mit DNA-Fragmenten kleiner als 350 bp bei 55 °C inkubiert. Dabei wurde der Ansatz mehrmals in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert, damit die Membran immer mit Puffer bedeckt blieb. Nachdem der Puffer abgenommen worden war, wurde die Membran nochmal mit 100 µl 1.0 M NaCl NET-Puffer 10 Minuten bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die vereinigten Pufferlösungen wurden anschließend 4 - 6mal zur Entfernung des Ethidiumbromids und zum Einengen der Lösung auf ca. 200 µl ausgeschüttelt. Vor der Ethanolfällung wurde die Lösung zur Entfernung restlichen Butanols noch einmal mit Chloroform ausgeschüttelt und 38 µl/200 µl Ansatz 10,5 M Ammoniumacetat zugegeben. Es wurde nämlich beobachtet, daß der Zusatz von Ammoniumacetat ein Ausfallen von NaCl bei der Zugabe von Ethanol verhindert (siehe Seite 22).

Isolierung über Elektroelution

Eine Alternative zur DNA-Fragmentisolierung aus einem Agarosegel über eine DEAE-Cellulosemembran ist die Isolierung über Elektroelution. Diese Methode eignet sich besonders zur Isolierung großer DNA-Fragmentmengen oder zur Isolierung von radioaktiv marklierten DNA-Fragmente, welche mit einem "Monitor" leicht verfolgt werden können. Die Elektroelution wurde in einer BIOTRAP-Apparatur nach Gebrauchsanleitung durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde anschließend wie oben bereits beschrieben mit Butanol ausgeschüttelt bzw. konzentriert und mit Ethanol gefällt.

FALLUNG VON DNA UND RNA

Zur Konzentrierung wurde eine DNA- bzw. RNA-Lösung in Anwesenheit von 1,7 M Ammoniumacetat mit 2 - 2,5 Volumen (v/v) bzw. 3 Volumen (v/v) eiskaltem Ethanol in Anlehnung an Maniatis et al. (1982) gefällt und mindestens eine Stunde bei -20°C belassen. Anschließend wurde die DNA- bzw. RNA-Lösung in den 1,3 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Sorvall SS34-Rotor (20.000 Upm, 1 Stunde, 4°C) oder in Sigma 2MK Zentrifuge (14000 Upm, 1 Stunde, 4°C) zentrifugiert, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach einer weiteren 30minütigen Zentrifugation nach dem Trocknen im Vakkum-Exsikkator in Tris-EDTA (TE)-Puffer (10 mM Tris-HCl (8,0), 1 mM EDTA) gelöst.

ENZYMATISCHE REAKTIONEN AN DNA

Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Die hydrolytische Spaltung von 0,3 - 40 μg DNA mit dem jeweiligen Restriktionsenzym erfolgte je nach DNA-Konzentration mindestens drei Stunden. Als Puffer wurde entweder das 5 Puffer System von der Fa. Boehringer Mannheim GmbH oder ein nach der Produktbeschreibung selbst hergestellter Puffer verwendet. Bei der Hydrolyse einer DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen wurden die Enzyme nacheinander eingesetzt, nachdem mit

einer Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert worden war, ob die erste Hydrolyse vollständig ablief. Die Reihenfolge der Enzyme wurde so gewählt, daß durch eine Verdünnung des Reaktionsansatzes die Reaktionsbedingungen der nachfolgenden Hydrolyse gut eingehalten werden konnte.

Hydrolyse von 5'-Phosphatresten mit alkalischer Phosphatase

Um eine Rcyclisierung des mit der Restriktionsendonuklease *Sma*I geschnittenen pUC 18-Vektors bei der Ligierung mit DNA-Fragmenten zu verhindern, mußten die 5'-Phosphatreste der glatten Enden abgespalten werden. Ca. 4 µg hydrolysierte pUC 18 DNA wurde im 10 µl Reaktionsansatz (0,1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)) mit ca. 19 Einheiten alkalische Phosphatase aus Kälberdarm 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf 50 °C aufgeheizt und nochmals mit ca. 19 Einheiten alkalische Phosphatase bei 37 °C 15 Minuten inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde dann auf 65 °C aufgeheizt und anschließend mit Phenol extrahiert und mit Ethanol gefällt.

[³²P]-Markierung mit Polynukleotid-Kinase

Für die Analyse von Protein-DNA-Bindungen durch Hydrolyse mit Exonuklease III mußte das zu analysierende DNA-Fragment an einem 5'-Ende radioaktiv markiert werden. Dafür wurde 10,5 µg pUC18-Vektor mit dem in die *Sma*I-Restriktionsstelle ligierten 746 bp langen DNA-Fragment des

Chalconsynthasegens an der HindIII-Restriktionsstelle hydrolytisch geöffnet und die 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase abgespalten (siehe oben). Anschließend wurden ca. 2,5 µg des dephosphorylierten DNA-Fragments mit 9 Einheiten Polynukleotidkinase und 30 - 50 µCi (γ - 32 P)ATP (5000 Ci/mmol) nach der Produktvorschrift der Fa. Boehringer Mannheim GmbH 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und von nicht-eingebautem (γ - 32 P)ATP mit dem Geneclean Kit (Fa. BIO 101) gereinigt. Nach Hydrolyse mit EcoRI Restriktionsendonuklease wurde das radioaktiv markierte 756 bp Fragment des Chalconsynthasegens nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel, wie oben beschrieben, isoliert. Die spezifische Aktivität des DNA-Fragments betrug 0,5 MCi/mol bzw. 17 PBq/mol. Ein PBq entsprechen 10^{15} Bq.

Auffüllen von überstehenden Enden und [32 P]-Markierung mit Klenow-Polymerase

Für die "blunt end" Ligation wie für die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurden die überstehenden Enden der DNA-Fragmente durch Klenow-Polymerase aufgefüllt. Für die Reaktion wurde das DNA-Fragment (bis 1,5 µg) in Tris-Puffer (0,1 M MgCl_2 , 0,01 M DTT, 0,7 M Tris-HCl (pH 7,6)) zusammen mit je 0,1 mM der Deoxyribonukleotidtriphosphate dATP, dGTP und dTTP bzw. mit 12 - 30 µCi (α - 32 P)dCTP (3000 Ci/mmol) und 1 Einheit Klenow-Enzym im 20 µl Ansatz 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit sterilem Wasser auf 50 µl aufgefüllt, mit Phenol extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt (siehe Seite 22).

[³²P]-markierte DNA wurde alternativ zur Phenolextraktion und Ethanol-fällung mit dem Geneclean Kit (Fa. BIO 101) gereinigt. Für die Ligation wurde die DNA nach der Ethanol-fällung in 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) aufgenommen. Bei allen anderen Verwendungen wurde die DNA in TE-Puffer gelöst. Die spezifische Aktivität der radioaktiv markierten DNA lag bei 2 - 179 MCi/mol bzw. 78 - 6300 PBq/mol.

Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden wurde eine Reaktion mit T4 DNA Ligase durchgeführt. In einer typischen Reaktion enthielt der Ansatz 80 fmol eines in einem Agarosegel elektrophoretisch gereinigten pUC18/SmaI-Vektors, 80 fmol des zu ligierenden DNA-Fragments mit aufgefüllten Enden, Ligasepuffer (10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,6 mM ATP, 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 15% (w/v) Polyethylenglykol 6000) und 2 Einheiten T4 DNA Ligase in 20 µl Gesamtvolumen. Der Ansatz wurde 16 Stunden bei 22 °C inkubiert und durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Der Ansatz wurde mit TE-Puffer mindestens fünffach verdünnt und davon ca. 50 - 70 ng DNA für die anschließende Transformation kompetenter *E. coli* eingesetzt.

ELEKTROPHORETISCHE VERFAHREN

Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe und zum Studium von Protein-DNA-Komplexen wurden horizontale 0,8 - 1,2%ige Agarosegele (140 x 175 mm bzw. 100 x 100 mm) verwendet. Der zweifache Probenpuffer für die Auftrennung von DNA-Fragmenten bestand in Anlehnung an Maniatis et al. (1982) aus 5% Ficoll 400 und 0,05% Bromphenolblau. Der zehnfache Probenpuffer für das Auftrennen von Protein-DNA-Komplexen bestand nach Schneider et al. (1986) aus 50% Glycerin, 0,1 M Dithiothreitol und 0,5% Bromphenolblau. Die Elektrophorese wurde wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben in einfachen TBE-Puffer (0,09 M Tris, 0,09 M Borsäure, 2 mM EDTA) mit 4 V/cm durchgeführt. Sofern die DNA nicht durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden konnte, wurde dem Agarosegel 1 - 2 µg/ml Ethidiumbromid beigegeben. Der DNA-Ethidiumkomplex fluoresziert dann unter UV-Licht bei Bestrahlung mit 366 bzw. 254 nm und kann mit einer Polaroidkamera fotografiert werden. Zur Erhöhung des Kontrasts wurden die Agarosegele manchmal nach der Elektrophorese in Wasser $\frac{1}{4}$ Stunde lang geschwenkt. Auf diese Weise diffundiert nicht DNA-gebundenes Ethidiumbromid aus dem Agarosegel.

Polyacrylamidgelelektrophorese

Zum Studium von Protein-DNA-Komplexen wurde in Anlehnung an Fried und Crothers (1981) eine vertikale Elektrophorese in einem nativen 4%igen Polyacrylamidgel (Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid = 82/1 in 0,38 M Tris-Cl (pH 8,8; Schneider et al., 1986) durchgeführt (Größe der Plattengele: 150 x 135 x 15 mm). Als Laufpuffer wurde nach Schneider et al. (1986) ein Tris-Glycin-Puffer (40 mM Glycin, 40 mM Tris-Cl (pH 8,5)) verwendet und nach ca. 20minütiger Vorelektrophorese die Hauptelektrophorese bei 10 V/cm durchgeführt. Der zehnfache Probenpuffer bestand aus 50% Glycerin, 0,1 M Dithiothreitol und 0,5% Bromphenolblau (Schneider et al., 1986). Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese in 10%iger Essigsäure von den Glasplatten abgelöst und auf einem Vakuumgeltrockner für die Autoradiographie getrocknet.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde in einem 7,5%igem Polyacrylamidtrenngel mit einem 3,0%igem Polyacrylamidsammelgel (Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid = 30/0,8) durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung der Gele und des Elektrophoresepuffers ist bei Laemmli (1980) beschrieben. Die Herstellung von 150x135x15 mm Plattengelen für die vertikale Gelelektrophorese, die Probenvorbereitung und die Durchführung der Elektrophorese bei 150 V (25 mA) wurde nach dem Beipackzettel *combithek* Eichproteine für die SDS-Gelelektrophorese von Boehringer Mannheim (Best. Nr. 750115) durchgeführt.

Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Produktanalyse von *in vitro* synthetisierter RNA bzw. von mit Exonuklease III hydrolysierten DNA wurde ein 4%iges bzw. ein 6%iges denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamidgel (135 x 350 mm) verwendet. 100 ml Gellösung eines 4%-Gels enthielt:

- 16,6 ml 30%iges Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (19/1)
- 42 g Harnstoff (7 M)
- 10 ml 10facher TBE-Puffer
- 170 µl N,N,N',N'-Tetramethylenbisacrylamid (TEMED)
- 600 µl Ammoniumperoxodisulfat (25mg/ml)

Als Laufpuffer wurde einfacher TBE-Puffer verwendet und nach ca. 30minütiger Vorelektrophorese bei 16 bzw. 13 V/cm die Taschen kräftig mit einer Plastikspritze ausgespült. Die Hauptelektrophorese wurde bei 19 bzw. 13 V/cm durchgeführt bis die Bromphenolblaubande ca. 16 cm weit gewandert war. Der Probenpuffer bestand aus 30 g Harnstoff, 25 g Ficoll, 0.5 g SDS und 0.25 g Bromphenolblau in 50 ml Wasser und wurde der Probe im Verhältnis 1:1 zugesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Ansätze drei Minuten lang bei 95 °C erhitzt und in Eis abgeschreckt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit 10%iger Essigsäure von den Glasplatten abgelöst und ca. eine $\frac{3}{4}$ Stunde in 10%iger Essigsäure geschwenkt. Die Essigsäurelösung wurde einmal durch frische 10%ige Essigsäure ersetzt. Vor der Autoradiographie bei -75 °C mit Verstärkerfolie wurden die Gele auf einem Vakuumtrockner ca. eine Stunde lang getrocknet.

TABAKZELLKULTUR

Suspensionskultur

Eine habituierte Wildtyp-Zelllinie *Nicotiana tabacum* var. White Burley (*N. tabacum*) von Lothar Willmitzer, Berlin (Köln) und Horst Steinbiß (Köln) wurden in einer Suspensionskultur gezüchtet. Die Kultur wächst in einem Linsmaier und Skoog (LS)-Medium (1965) ohne Phytohormone in Schüttelkultur (100 - 130 Upm) bei 24 - 26 °C und Dauerlicht. Zur Herstellung des LS-Mediums wurden vier Stammlösungen hergestellt und bei 4 °C gelagert:

Stammlösung 1: 165 g NH_4NO_3

190 g KNO_3

37 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

ad 2 l

Stammlösung 2: 17 g KH_2PO_4

44 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

3,73 g EDTA (in Wasser bei pH 7 gelöst)

2,78 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

ad 0,8 l

Stammlösung 3: 0,62 g H_3BO_3

1,69 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,68 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 ml 0,5 M KJ

1 ml 0,1 M Na_2MoO_4

0,1 ml 0,1 M CoCl_2

ad 0,2 l

Stammlösung 4: 10 g myo-Inosit

40 g Thiaminiumdichlorid

ad 0,2 l

Stammlösung 1 bis 3 wurden autoklaviert und Stammlösung 4 wurde steril
filtriert.

Für 1 l LS-Medium wurden verwendet:

20 ml Stammlösung 1

8 ml Stammlösung 2

2 ml Stammlösung 3

2 ml Stammlösung 4

20 g Saccharose

pH 6,3 mit NaOH

Das Nährmedium wurde in 50 ml Portionen in 300 ml Erlenmeyerkolben
autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zweimal wöchentlich
wurden drei Kolben der Suspensionskultur mit einer sterilen Glaspipette
(1,5 - 2 Füllungen) wie bei Schöffner (1988) genau beschrieben umgeimpft.
Zur Aufzucht größerer Zellmengen (200 - 600 g) wurde eine dicht gewach-
sene 50 ml Kultur in 200 ml Nährmedium in einem Fernbachkolben umge-
schüttet und nach ca. fünf Tagen geerntet.

Callus-Kultur

Zur Sicherung der Zellkultur wurden sogenannte Callus-Kulturen angelegt, indem mit einer sterilen Glaspipette Zellen aus der Suspensionskultur auf Agarplatten (Durchmesser 5 cm) übertragen wurden (1,5 g Agar/200 ml LS-Medium). Locker gewachsene Bereiche der Calli (ca. kirschkerngroß) konnten dann nach 5 - 6 Wochen mit einer sterilen Pinzette auf neue Agarplatten umgesetzt werden.

AUFSCHLUSS VON TABAKZELLEN

Zum Aufschluß von geernteten Tabakzellen (200 - 600 g Naßgewicht) zur Isolierung von Zellkernen wurden zwei Verfahren angewandt. Das erste Verfahren beinhaltet einen enzymatischen Schritt zum Abbau von Pflanzenzellwänden (Willmitzer & Wagner, 1981). Das zweite Verfahren hingegen bricht nach Murray und Thompson (1980) tiefgefrorene Pflanzenzellen rein mechanisch auf.

Aufschluß durch enzymatische Hydrolyse

Die Pflanzenzellen (bezogen auf 200 g Naßgewicht) wurden durch Absaugen mit einer Nutsche (Durchmesser 13,5 cm) auf einem Nylonnetz (Porengröße 100 µm) gewonnen und mit 1 l Puffer A (s. u.) gewaschen. Anschließend wurden sie in 1 l Puffer A überführt und bei 24 - 26 °C 15 Minuten geschüttelt. Nach erneutem vorsichtigen Absaugen der nun im hypotonischen Puffer A

leicht geschrumpften Pflanzenzellen wurden sie in 1 l Puffer B (s. u.) gegeben und bei 24 - 26 °C 1½ Stunden inkubiert. Während der enzymatischen Hydrolyse durch Cellulase und Pectinase in Puffer B wurden die Pflanzenzellen unter dem Mikroskop rundlich, was auf das Entstehen von Protoplasten hindeutet. Da die Zellen in den hypotonischen Puffer A und B nach ca. zwei Stunden stark geschrumpft sind, wurden sie über zwei übereinandergelegte Nylonnetz (100 µm) vorsichtig abgesaugt und mit ½ - 1 l Puffer C (s. u.) gewaschen. Nun wurden die gewaschenen Zellen in ca. 400 ml vorgekühltem Puffer C überführt und im Kühlraum viermal 15 Sekunden lang mit einem Ultra-Turrax T 45 Mixstab (Messeraufsatz 6G) homogenisiert. Gegen die starke Schaumbildung wurde etwas n-Oktanol zugesetzt. Dieses Verfahren wurde solange wiederholt, bis unter dem Mikroskop mehr als 90% der Zellen aufgebrochen waren. Aufgebrochene Zellen erschienen im Lichtmikroskop dunkel im Gegensatz zu intakten hell leuchtenden Zellen. Ein zu langes Homogenisieren muß unbedingt vermieden werden, da dadurch kleinste Zellfragmente entstehen, die von den Zellkernen nicht mehr abzutrennen sind.

Aufschluß im tiefgefrorenen Zustand

Eine Alternative zum enzymatischen Aufschluß von Pflanzenzellen ist der rein mechanische Aufschluß im tiefgefrorenen Zustand. Die Zellen werden zuerst durch Absaugen über ein Nylonnetz (Porengröße 100 µm) in einer Nutsche (Durchmesser 13,5 cm) gewonnen und mit ½ - 1 l Puffer C (s. u.) gewaschen. Nach dem Trockensaugen der Zellen werden sie auf einer

dicken Alufolie ziemlich dünn ausgestrichen und im Kühlraum durch Übergießen mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Durch Falten der Alufolie springen die tiefgefrorenen Zellen als kleine Klumpen ab, welche in einem Mörser (Durchmesser 32 cm) leicht pulverisiert werden können. Beim Pulverisieren im Mörser muß unbedingt darauf geachtet werden, daß die Zellen beim Auftauen zur Inhibierung der Phenoloxidasen mit Puffer C übergossen werden, ansonsten werden sie sehr schnell braun. Sind sie jedoch einmal in Puffer C suspendiert, so ist ein weiteres Homogenisieren im Mörser ohne Reibsand wenig effektiv. Anschließend kontrolliert man unter dem Mikroskop, ob die meisten Zellen aufgebrochen wurden. Der Vorteil dieser Methode ist, daß die Zellen in wesentlich kürzerer Zeit aufgebrochen werden können als durch enzymatische Hydrolyse. Der Nachteil dieser Methode ist, daß kleinste Zellfragmente entstehen, die von den Zellkernen nicht mehr abzutrennen waren. Aus diesem Grund wurden die Tabakzellen in der Regel durch enzymatische Hydrolyse aufgeschlossen.

ISOLIERUNG VON TABAKZELLKERNEN

Zur Isolierung von Tabakzellkernen aus den bereits aufgeschlossenen Tabakzellen (s. o.) wurde das Homogenat von 200 g Zellen (Naßgewicht) in ca. 400 ml Puffer C (s. u.) durch ein Miracloth-Tuch filtriert. Der Zellkuchen wurde mit Puffer C mehrmals gewaschen und kräftig ausgepresst. Anschließend wird die filtrierte Kernsuspension nacheinander durch drei

Nylonfilter mit sinkender Porengröße (100 μm , 80 μm , 22 bzw. 20 μm) filtriert und mit wenig Puffer C nachgewaschen. Dabei ist es besonders wichtig, daß die Kernsuspension schnell durch die Nylonfilter fließt. Sollte einmal ein Filter verstopfen, so muß er zwischendurch gereinigt werden. Auf jeden Fall darf die Suspension nicht durch die Filter gepreßt werden. Bei allen Filtrationsschritten ist ferner darauf zu achten, daß das Volumenverhältnis von 200 g Zellen zu 600 ml Puffer C (3 Volumen (w/v)) nicht überschritten wird. Nach dem letzten Filtrationsschritt wurde die Kernsuspension zweimal in der Ausschwingzentrifuge Cryofuge 6-6 (2700 Upm, 20 min, 4 °C, ohne Auslaufbremse) zentrifugiert und die Niederschläge mit den Kernen in soviel Puffer C vorsichtig mit einer 5 ml Gilson-Pipetman suspendiert, daß ein Gesamtgewicht von 42 g erreicht wird. Zu dieser Kernsuspension werden 63 g vorgekühlter Puffer D (s. u.) gegeben und beide Lösungen durch vorsichtiges Schwenken im Erlenmeyerkolben vermischt (Mischverhältnis Puffer C : Puffer D = 6 : 9, Schöffner (1988)). Nach Zentrifugation in einer Ausschwingzentrifuge Labofuge II (2600 Upm, 5 min, 4 °C, ohne Auslaufbremse) wurde der Niederschlag mit den Kernen in 20 ml Puffer E (s. u.) vorsichtig suspendiert und die anschließende Dichtezentrifugation in einer Ausschwingzentrifuge Hettich Rotixa (5600 Upm, 10 min, 4 °C, ohne Auslaufbremse) durchgeführt. Die oben schwimmende Schicht von Kernen wurde vorsichtig abpipettiert und 3 - 4mal mit Puffer C gewaschen und zentrifugiert (Hettich Rotixa, 1250 Upm, 5 min, 4 °C oder Labofuge II, 2600 Upm, 5 min, 4 °C, jede ohne Auslaufbremse) bis der Überstand klar wurde. Das ganze oder aliquotierte Kernpellet konnte anschließend in flüssigem Stickstoff beliebig lange aufbewahrt werden.

Es ist noch wichtig anzumerken, daß alle Reinigungsschritte unter dem Mikroskop kontrolliert wurden. Die Ausbeute an Zellkernen wurde durch entsprechende Verdünnung eines Aliquots und Zählen in einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Sie betrug maximal 2×10^8 Kerne und konnte durch eine Erhöhung der Zellmasse nicht wesentlich gesteigert werden.

Zusammensetzung der Puffer:

Puffer A: Enkonzentration:

127,54 g Mannitol (700 mM)
1,95 g MES (10 mM)
10 ml 0.5 M EDTA (5 mM)
1,0 g Rinderserumalbumin (0,1%)
ad 1000 ml, pH 5,8
34,84 µg Phenylmethylsulfonylfluorid (0,2 mM)
in 5 ml iso-Propanol

Puffer B:

Puffer A (1000 ml)
+ 100 mg Pectinase
+ 150 mg Cellulase

Cellulase und Pectinase wurden wie bei Willmitzer und Wagner (1981) beschrieben über eine Biogel P6 Säule vorgereinigt.

Puffer C (5x):

427,88 g Saccharose (250 mM)
2,92 g 5 M NaCl (10 mM)
50 ml 1 M MES (pH 6,0) (10 mM)
25 ml 0,5 M EDTA (2,5 mM)
30 g Nonidet P40 (0,6%)
5 g Rinderserumalbumin (0,1%)
522 mg Spermin (0,15 mM)
1273 mg Spermidin (0,5 mM)
ad 1000 ml, pH 6,0

Der 5x Puffer C wurde bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde dazugegeben:

1,4 ml 2-Mercaptoethanol/l (20 mM)
34,84 µg Phenylmethylsulfonylfluorid/l (0,2 mM)
in 5 ml iso-Propanol

Puffer D:

zu 116,0 g Percoll (Pharmacia)
30,0 g 5x Puffer C mit 180 µl 2-Mercaptoethanol
unter Rühren langsam dazugegeben
pH 6,0 mit 1 M HCl

Puffer E:

zu 45,0 g Percoll
6,0 g 5x Puffer C mit 35 µl 2-Mercaptoethanol
unter Rühren langsam dazugegeben
pH 6,0 mit 1 M HCl

Puffer A, B, D, und E wurden vor jeder Zellkernanreicherung neu hergestellt.

EXTRAKTION VON TABAKZELLKERNEN

Extraktion intakter Zellkerne

Nach dem Auftauen tiefgefrorener Tabakzellkerne in Eis wurden sie zweimal mit je 100 μ l Kernstabilisierungspuffer (Puffer I, s. u.) (w/v ca. 1/1) (modifiziert nach Willmitzer und Wagner, 1981) bei 4 °C gewaschen und zentrifugiert (Runne Mod. 85-1, Einstellung 5, 5 min, 4 °C ohne Auslaufbremse). Die gewaschenen Kerne wurden danach in 30 μ l Puffer I suspendiert, 70 μ l Puffer II (s. u., modifiziert nach Willmitzer und Wagner, 1981, K. Thalmeier, persönl. Mitteilung) dazugegeben und eine Stunde unter gelegentlichem Schwenken in Eis extrahiert. Nach Zentrifugation (Runne Mod. 85-1, Einstellung 7, 5 min, 4 °C ohne Auslaufbremse) wurde der Überstand abgenommen und das Kernpellet mit 100 μ l Puffer I gewaschen und erneut in einer Runne Mod. 85-1 Zentrifuge unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Zuletzt wurden die vereinigten Überstände klar zentrifugiert (Runne Mod. 85-1, Einstellung 10, 2 min, 4 °C).

Puffer I:

- 200 μ l 5fach Stammpuffer (50 mM MES (pH 6,0), 1 mM EDTA,
7,5 mM $MgCl_2$, 7,5 mM KCl)
- 250 μ l 80%iges Glycerin (20% Endkonzentration)
- 50 μ l 10 mM DTT (0,5 mM)
- 50 μ l 10 mM Phenylmethylsulfonylfluorid in iso-Propanol (0,5 mM)
- 450 μ l H_2O

Puffer II:

- 20 µl 5fach Stammpuffer (siehe Puffer I)
- 25 µl 80%iges Glycerin
- 5 µl 10 mM DTT
- 5 µl 10 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
- 7 µl 5 M NaCl (350 mM)
- 8 µl H₂O

Extraktion aufgebrochener Zellkerne

Vor dem Aufbrechen der Zellkerne wurden die in Eis aufgetauten Kerne zweimal mit 500 – 1000 µl Puffer III (s. u.; w/v ca. 1/1) gewaschen und zentrifugiert (Labofuge II, 2600 Upm, 5 min, 4 °C oder Runne Mod. 85-1, Einstellung 5, 5 min, 4 °C, jede ohne Auslaufbremse). Danach wurden die Kerne in Puffer IV (s. u.) suspendiert und in die autoklavierte und vorgekühlte Parr-Bombe überführt. Nach dem Anlegen eines 110 bar großen N₂-Drucks wurde die Kernsuspension bei 110 bar eine Stunde unter mehrmaligem Schütteln bei 4 °C äquilibriert und der Inhalt durch sehr langsames Öffnen des Reduzierventils entleert. Anschließend wurde die Parrbombe mit 100 µl Puffer IV unter Druck nachgespült und die vereinigten Homogenate in einer Labofuge II (full speed, 5 min, 4 °C) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 200 µl Puffer IV (ohne NaCl) aufgenommen und zentrifugiert (Runne Mod 85-1, Einstellung 10, 5 min, 4 °C oder Sorvall SS34, 10.000 Upm, 10 min, 4 °C). Die vereinigten Überstände beider Zentrifugationen wurden erneut bei hoher Umdrehungszahl zentrifugiert bis die Überstände klar waren.

Zusammensetzung der Puffer:

Puffer III:

- 200 μ l 5fach Stammpuffer (siehe Puffer I)
- 250 μ l 80%iges Glycerin
- 50 μ l DTT
- 50 μ l Phenylmethylsulfonylfluorid in iso-Propanol
- 450 μ l H_2O

Puffer IV:

- 200 μ l 5fach Stammpuffer (250 mM Tris-Cl (pH 7,9), 5 mM EDTA, 37,5 mM $MgCl_2$)
- 250 μ l 80%iges Glycerin
- 50 μ l 10 mM DTT
- 50 μ l 10 mM Phenylmethylsulfonylfluorid in iso-Propanol
- 70 μ l 5 M NaCl

REINIGUNG VON ZELLKERNEXTRAKTEN

Chromatographie an DEAE-Sepharose

Die Kernextrakte wurden vor der DEAE-Sepharosechromatographie mit Puffer IV (s. o., jedoch ohne NaCl) auf eine ca. 0,2 M NaCl-Konzentration verdünnt und auf eine DEAE-Sepharose CL 6B-Säule gegeben ($0,8 \text{ cm}^2 \times 8 \text{ cm}$). Die Säule war zuvor mit 0,05 M NaCl Puffer IV (Elutionspuffer) äquilibriert und wurde mit 10ml/Stunde eluiert. Der Auslaufschlauch der Säule war mit einem Durchflußphotometer Modell 8300 Uvicord II (Fa. LKB) verbunden, an dem ein Fraktionskollektor angeschlossen war. Es wurden jeweils 20 Tropfen pro Fraktion (ca. 1,1 ml) gesammelt. Die Salzkonzentration des Elutionspuffers wurde stufenweise von 0,05 M NaCl auf 1,0 M NaCl erhöht. Anschließend konnte die Säule bei 4°C in 0,05 M NaCl-Puffer IV mit 0,02% NaN_3 gelagert werden.

Ammoniumsulfatfällung

Die 0,05 M Eluate der DEAE-Sepharose-Chromatographie wurden vereinigt und innerhalb von 20 - 30 Minuten portionsweise 39,8 g/100 ml (65%ige Sättigung) pulverisiertes Ammoniumsulfat zugegeben. Der pH-Wert von 7,9 stieg bei der Fällung nur um 0,25, so daß auf eine Rücktitration verzichtet wurde. Die Fällung äquilibrierte anschließend in einem 12,5 ml SS34 Zentrifugenbecher oder, aliquotiert auf 1,3 ml Portionen, in Eppendorf-Reaktions-

gefäße in Eis über Nacht. Nach der Zentrifugation in einem Sorvall SS34 (20.000 Upm. 60 min. 4 °C) wurde der Überstand äußerst vorsichtig vom flockigen Niederschlag abgenommen und in 1 ml 0,05 M NaCl-Elutionspuffer mit 0,40 g Ammoniumsulfat suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation in einem Sorvall SS34 (20.000 Upm. 30 min. 4 °C) wurde der Niederschlag in 150 µl 0,05 M NaCl Puffer IV (s. o) gelöst und gegen 0,05 M NaCl Puffer IV dialysiert.

LAGERUNG VON KERNEXTRAKTPROTEINEN

Fraktionierte oder unfraktionierte Proteine des Kernextrakts wurden in Puffer IV mit 0,05 - 1,0 M NaCl im flüssigen Stickstoff auf unbegrenzte Zeit aufbewahrt.

DIALYSE VON PROTEINEN

Eine Dialyse von stimulierender Aktivität oder RNA-Polymerase gegen 0,05 M NaCl Puffer IV (s. o.) wurde entweder über Nacht in Schütt Disk-Dialysekammern oder mindestens $2\frac{1}{2}$ Stunden lang auf Millipore Dialysefilter durchgeführt. Eine Dialyse von RNA-Polymerase aus Tabakzellkernen im Dialyseschlauch führte selbst in Anwesenheit von 0,02% Triton X100 zur Inaktivierung des Enzyms.

KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN

Qualitative Bestimmung

Während der Anreicherung von stimulierender Aktivität und RNA Polymerase wurde die Elution von Protein durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm in einem Durchflußphotometer Modell 8300 Uvicord II (Fa. LKB) verfolgt.

Quantitative Bestimmung

Die quantitative Bestimmung von Protein wurde im Bereich von 0,7 - 6,0 µg/ml Protein nach einer Methode von Bradford (1976) und Spector (1978) durchgeführt. Parallel zu den unbekannten Proben wurde eine Vergleichsbestimmung mit bekannten Mengen Rinderserumalbumin (0,7 - 6,0 µg Protein) durchgeführt. Proteinlösungen mit einer größeren Konzentration wurden entsprechend verdünnt und anschließend nach Bradford (1976) und Spector (1978) quantitativ bestimmt.

STANDARDTRANSKRIPTIONSANSATZ

Zur quantitativen Bestimmung der stimulierenden Aktivität und der RNA Polymerase Aktivität wurde ein von Szopa und Wagner (1984) beschriebener Transkriptionspuffer modifiziert. Der verwendete Transkriptionspuffer enthält 50 mM Tris-Cl (7.9), 10 mM MgCl_2 und 2 mM DTT. Verwendet man statt Magnesiumchlorid Manganchlorid, so wird bei der Herstellung eines 6fach konzentrierten Puffers die Bildung eines braunen Niederschlags beobachtet. Aus diesem Grunde wurde nur Magnesiumchlorid eingesetzt. Ferner wurden als Substrate 175 μM ATP, 175 μM GTP, 182 μM CTP und 2,8 μM UTP (0,1 - 11 μCi (α - ^{32}P)UTP) eingesetzt (modifiziert nach Mernes et al. (1978)). Als DNA-Konzentration wurden falls nicht anders angegeben 0,82 o. d. $_{260}/\text{ml}$ polyd(A-T)·d(A-T) gewählt. Beim Nachweis der stimulierenden Aktivität muß unbedingt darauf geachtet werden, daß die Salzkonzentration im Ansatz nicht höher als 25 mM NaCl ist. Gestartet wurde die Reaktion in der Regel durch Zugabe von 73 nM oder 37 nM DNA-abhängige RNA Polymerase B (II) aus Weizenkeimen (bezogen auf den Proteingehalt).

Durchführungsschema:

Lösung A: Salz- und Substratlösung

- nx10 µl sechsfacher Transkriptionspuffer (300 mM Tris·Cl (pH 7,9),
60 mM MgCl₂, 12 mM DTT)
- nx12 µl Ribonukleosidtriphosphatlösung (240 µl 3,5 mM ATP
336 µl 2,5 mM GTP
336 µl 2,6 mM CTP
48 µl 0,3 mM UTP
ad 960 µl)
- nx 0,1 - 11 µCi (α -³²P)UTP (400 Ci/mmol bzw. 3000 Ci/mmol)
- nxm µl DNA-Lösung

Lösung B: Proteinextraktlösung

- nxm µl Tabakzellkernextrakt (2,5 - 3,5 µg Protein) oder 0,05 M bzw.
0,1 M NaCl Puffer IV (siehe oben)

Lösung C: Startlösung

- nx2 µl RNA Polymerase II aus Weizenkeimen oder Wasser

Gesamtvolumen: 60 µl

n Anzahl der Ansätze je Versuchsreihe

m Volumen der DNA- bzw. Protein-Lösung entsprechend der eingesetzten
DNA- bzw. Proteinmenge (siehe Legenden der Abbildungen)

Nach einer 15minütigen Inkubation bei 30 °C wurden in Anlehnung an Johnston und McClure (1976) je 10 µl der Inkubationsansätze auf eine Startlinie in 3½ cm Höhe eines 3 cm breiten und 21 cm hohen Whatman 3MM Streifens strichförmig aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde eine aufsteigende Chromatographie bis zu einer Fließmittelfronthöhe von 12 - 17 cm (bezogen auf die Startlinie) in Fließmittel III (Hurlbert, 1957: 1 l 0.1M Natriumphosphat (pH 6.8) + 600 g Ammoniumsulfat + 20 ml n-Propanol) durchgeführt. Nach der Entwicklung wurden die Chromatogramme ca. 15 Minuten unter Infrarot-Strahlern getrocknet, ein 1 cm hoher Streifen an der Startlinie herausgeschnitten und zusammen mit einem Scintillator-Cocktail (16 g PPO + 200 mg POPOP in 4 l Toluol) in einem Flüssigkeits-Scintillations-Zähler gezählt (×6 = Gesamt-RNA-Synthese). Parallel dazu wurden je 5 µl Inkubationslösung auf einen 1 cm hohen und 3 cm breiten Whatman 3MM Streifen punktförmig aufgetragen, getrocknet und zusammen mit einem Scintillator-Cocktail wie oben beschrieben gezählt (×12 = Gesamt-Radioaktivität). Danach erfolgt eine statistische Auswertung der Gesamt-Radioaktivität einer Versuchsreihe nach Stähler (1977) und zwar wird der Mittelwert und der Variationskoeffizient als "Maß für die Unpräzision der Messung" errechnet. Der Variationskoeffizient schwankte bei allen Versuchen zwischen 1,6 und 7,0%. Der Mittelwert der Variationskoeffizienten betrug $3,9 \pm 1,5\%$. Zum quantitativen Vergleich der Chromatogramme und zum Ausgleich möglicher Pipettierfehler wurde die gemessenen Werte der Gesamt-RNA-Synthese mit der gemessenen Gesamt-Radioaktivität multipliziert und durch den Mittelwert der Gesamt-Radioaktivitäten der Versuchs-

reihe dividiert. Anschließend wurde von jedem Wert eines 1 cm Streifens der Leerwert (erhalten aus einem Experiment ohne Enzym) abgezogen. Nach der Leerwertkorrektur wird der radioaktive Einbau von (α - ^{32}P)UTP in das radioaktive Produkt in pmol/60 μl errechnet. Die hierfür verwendete Formel lautet:

$$\text{markierte Produktmenge} = \frac{R \times [S]}{M} \times 60 \quad (\text{pmol})$$

mit R = Radioaktivität des Produkts (cpm)

[S] = nichtradioaktive Nukleotidkonzentration im Ansatz (μM)

M = errechnete Mittelwert der Gesamtradioaktivität pro
Chromatogramm (cpm)

Anschließend konnten die errechneten Werte tabellarisch oder graphisch dargestellt werden.

NACHWEIS VON PROTEIN-DNA-BINDUNG

Bindung an Nitrocellulose

Radioaktiv markierte Protein-DNA-Komplexe können nach McEntee et al. (1980) durch Bindung an alkali-vorbehandelte Nitrocellulose quantitativ gemessen werden. Die Nitrocellulosefilter werden dafür zuerst bei Raumtemperatur in 0,5 M Kaliumhydroxidlösung 20 Minuten lang inkubiert und

anschließend bis zu einem pH-Wert von 7 - 8 mit destilliertem und autoklaviertem Wasser gewaschen. Danach werden die Filter 45 Minuten lang in 0,1 M Tris-Cl (pH 7,5) inkubiert. Nach McEntee et al. (1980) halten auf diese Weise vorbehandelte Filter weniger als 2% einzelsträngige oder doppelsträngige DNA zurück. Im Gegensatz dazu binden Protein-DNA-Komplexe effizient an Nitrocellulose. Die ungebrauchten Filter können bei 4 °C in 0,1 M Tris-Cl (pH 7,5) mehrere Wochen gelagert werden.

Gelretention

Zum qualitativen Nachweis von Protein-DNA-Komplexen kann die Eigenschaft benutzt werden, daß die Komplexe in einem nativen Gel langsamer wandern als ungebundene DNA. Zur Bildung der Protein-DNA-Komplexe wurden 1,3 - 2,3 µg Protein mit 0,04 - 0,11 pmol (0,5 - 170 MCi/mol bzw. 17 - 6300 PBq/mol) radioaktiv markierte DNA in einem 30 µl Ansatz mit 25 mM Hepes (pH 7,5), 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10% Glycerin, 150 mM NaCl und 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (Schneider et al., 1986) 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend auf einem nativen Polyacrylamidgel (in Anlehnung an Fried und Crothers, 1981) oder auf einem Agarosegel (in Anlehnung an Ou-Lee et al., 1988) elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht (siehe oben).

Ergebnisse

Entdeckung einer RNA Polymerase-stimulierenden und einer DNA-bindenden Aktivität

Gereinigte Kerne aus Tabakzellen enthalten eine Reihe von Kern-spezifischen Enzymen, darunter DNA-abhängige RNA Polymerasen (Willmitzer & Wagner, 1981). Im Gegensatz zu *E. coli* RNA Polymerase können hochgereinigte eukaryotische RNA Polymerasen keine spezifischen Stellen auf der DNA-Matrize erkennen (Cooke et al. 1984). Hochgereinigte RNA Polymerase B (II) aus Weizenkeimen besitzt zudem in der primerunabhängigen Dinukleotidsynthese mit einem DNA-Fragment des Nopalinsynthasegens als Matrize eine ca. 10^6 fache geringere Aktivität als *E. coli* RNA Polymerase Holoenzym (Bösl, 1985). Untersuchungen an tierischen Zellkernen ergab, daß das Binden von Kernproteinfaktoren an regulatorische DNA-Sequenzen die Transkription von RNA Polymerase II spezifischen Genen sowohl in ihrem Ausmaß, als auch in ihrem Startpunkt beeinflußt (Maier et al., 1987).

Extrahiert man gereinigte Tabakzellkerne mit 0,05M MES-Puffer, der 0,35M NaCl enthält und inkubiert den klarzentrifugierten Extrakt zusammen mit Ribonukleosidtriphosphaten einschließlich (α - 32 P)UTP und einem DNA-Restriktionsfragment, so findet man nach einer aufsteigenden Chroma-

tographie auf Whatman 3MM Papier auf der Auftragsstelle Radioaktivität. Freies (α -³²P)UTP hingegen wandert an der Lösemittelfront (Johnston & McClure, 1976). Der auf diese Weise gewonnene Kernextrakt enthält somit RNA Polymerase-Aktivität. Führt man mit dem Extrakt einen Nitrocellulose-Bindungstest (McEntee et al., 1980) mit DNA-Fragmenten des Chalconsynthasegens durch, so werden im Kernextrakt DNA-Bindeaktivitäten gefunden. Da diese DNA-Bindeaktivitäten auch durch eine Bindung von endogener RNA-Polymerase aus Tabakzellkernen an das zugegebene DNA-Restriktionsfragment verursacht werden könnte, wurde der Extrakt zur Abtrennung der RNA Polymerase-Aktivität in Anlehnung an Mans (1973) über eine DEAE-Sepharose-Säule fraktioniert. Durch diese Fraktionierung wurden zwei Fraktionen erhalten. Das erste Eluat mit 0,05M NaCl zeigt im Nitrocellulose-Bindungstest (McEntee et al., 1980) DNA-bindende Aktivität, aber keine RNA Polymerase Aktivität. Zur Konzentrierung dieser DNA-bindenden Aktivität wurde in Anlehnung an Bohmann et al. (1987) eine 65%ige Ammoniumsulfatfällung durchgeführt (siehe Material und Methoden). Gibt man anschließend in einem Standardtranskriptionsansatz (modifiziert nach Szopa & Wagner, 1984) zu dem ammoniumsulfatgefällten 0,05M NaCl Eluat RNA Polymerase aus Weizenkeimen, so wird eine Stimulierung der Weizenkeim RNA Polymeraseaktivität gemessen. Das Ausmaß der Stimulierung ist linear abhängig von der eingesetzten Proteinmenge des konzentrierten Eluates. Mit der Entdeckung einer RNA Polymerase II-stimulierenden und DNA-bindenden Aktivität im fraktionierten Kernextrakt war somit die Aufgabe gegeben, diese Aktivitäten näher zu charakterisieren.

Die zweite Fraktion der DEAE-Sepharose-Chromatographie wurde durch Elution mit 1.0M NaCl erhalten. In einem Nitrocellulose-Bindungstest (McEntee et al., 1980) enthält dieses Eluat keine DNA-bindende Aktivität wie das 0.05M NaCl Eluat (ohne Beleg). Im Gegensatz dazu kann jedoch in einem Standardtranskriptionsansatz im 1.0M NaCl Eluat RNA Polymerase-Aktivität gemessen werden. Die RNA-Polymerase ist somit quantitativ von der stimulierenden Aktivität im 0.05M NaCl Eluat abgetrennt worden.

Störende Aktivitäten im Kernextrakt

Vor einer Charakterisierung der stimulierenden Aktivität und ihrer chemischen Natur ist es notwendig, auf störende Aktivitäten im Kernextrakt wie Proteasen und Nukleasen zu prüfen. Insbesondere Nukleasen finden sich bei Pflanzen in chromatinassoziiierter Form (Wilson, 1975).

PROTEASEN

Zum Nachweis von Proteasen im unfractionierten Kernextrakt wurde käufliche Aldolase in An- und Abwesenheit von Kernextrakt eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Analyse auf einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe Material und Methoden) zeigt, daß sich die coomassiegefärbte Bande der Aldolase durch die Inkubation mit dem Kernextrakt in ihrer Intensität und in ihrer Wanderungsstrecke nicht ändert (Fig. 1). Eine Verminderung der Intensität

1 2



Fig. 1 Gelelektrophoretische Analyse des Tests auf Proteasen im Kernextrakt mit Aldolase

2 μg Aldolase wurden ohne (1) und mit (2) 2.4 μg Kernextrakt in je 30 μl Transkriptionsansatz (siehe Material und Methoden) ohne DNA eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die gelelektrophoretische Analyse erfolgte über ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970).

der gefärbten Aldolasebande oder das Auftreten zusätzlicher Banden durch Proteaseabbau könnte gerade noch bis ca. 0.3 μg Protein/Bande auf dem SDS-Polyacrylamidgel erkannt werden (Ausubel et al., 1987). Bei einer eingesetzten Proteinmenge von 2 μg Aldolase bedeutet dies, daß noch eine Proteaseaktivität erkannt worden wäre, die 15% der eingesetzten Aldolase in einer Stunde bei 37 °C abgebaut hätte. Innerhalb dieser Fehlergrenze ist somit im unfraktionierten Kernextrakt keine Proteaseaktivität nachzuweisen. Auf weitere Prüfungen auf Protease in fraktionierten Kernextrakten wurde verzichtet.

DNasen

Zum Nachweis von DNasen im unfraktionierten Kernextrakt wurde Plasmid-DNA in An- und Abwesenheit von 2.4 µg Kernextrakt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Produktanalyse nach Elektrophorese in einem Agarosegel mit Ethidiumbromid als Intercalationsfarbstoff zeigt einen vollständigen Abbau der Plasmid-DNA-Banden (Fig. 2, Spur 2). Aus diesem Grund wurde in einer parallelen Versuchsreihe einige DNase-Inhibitoren auf ihre Fähigkeit die im Kernextrakt enthaltenen DNasen zu inhibieren getestet. In Anlehnung an Jervis (1974a) und Suwalsky et al. (1969) wurde zuerst geprüft, ob Spermin und Spermidin die DNasen-Aktivitäten inhibieren können. Bei diesem Experiment zeigt sich, daß auch in Anwesenheit von 0,8 mM Spermin und 2,5 mM Spermidin die Plasmid-DNA vollständig hydrolysiert wird (Fig. 2, Spur 5).



Fig. 2 Gelelektrophoretische Analyse des Tests auf DNasen im Kernextrakt mit pUC18 Plasmid-DNA

Je 0,26 µg pUC 18 DNA wurden in einem Endvolumen von 12 µl mit je 2,4 µg Kernextrakt in An- oder Abwesenheit von DNase-Inhibitoren eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Die gelelektrophoretische Analyse erfolgte in einem 0,6%igen Agarosegel.

- 1 pUC 18 ohne Extrakt und ohne DNase-Inhibitor
- 2 pUC 18 mit Extrakt und ohne DNase-Inhibitor
- 3 pUC 18 mit Extrakt und mit 0,2 M Citrat
- 4 pUC 18 mit Extrakt und mit 0,04 M EGTA
- 5 pUC 18 mit Extrakt und mit 0,8 mM Spermin und 2,5 mM Spermidin

Nach Untersuchungen von Moore (1981) zeigt DNase aus Rinderpankreas auch in Anwesenheit von 2.5 mM MgCl_2 mit 10^{-5}M EGTA (pH 8.0) keine Aktivität mehr. Bei diesen Inkubationsbedingungen bindet EGTA Calcium 10^6 mal besser als Magnesium (Moore, 1981) und Price fand schon 1972 heraus, daß DNase A mehrere Calciumbindungsstellen besitzt (Price, 1972). Es stellte sich daher die Frage, ob die im Kernextrakt enthaltenen DNasen ebenso wie DNase aus Rinderpankreas durch EGTA gehemmt werden können. Neben EGTA wurde noch der Komplexbildner und DNase-Inhibitor Citrat getestet, da bei einer Konzentration von 0,01M Citrat magnesiumaktivierte DNase aus Rinderpankreas vollständig inhibiert wird (Davidson, 1972).

Trotz einer hohen Konzentration von EGTA (0,04M) im Inkubationsansatz wird die DNase-Aktivität nur vermindert denn es sind immer noch DNA-Fragmente als sehr breite Zone auf dem Agarosegel sichtbar (Fig. 2, Spur4). 0,2M Citrat hemmt stärker, doch erscheinen die Plasmid-DNA-Banden im Agarosegel diffuser und in ihrer elektrophoretischen Mobilität verändert (Fig. 2, Spur 3).

Offensichtlich sind die im Tabakzellkernextrakt enthaltenen DNasen zu aktiv, um durch DNase-Inhibitoren wie Spermin, Spermidin und EGTA gehemmt werden zu können. Citrat hemmt von den getesteten Inhibitoren vorhandene DNasen am besten.

RNasen

Da in Tabakblättern das Verhältnis von RNase I zu DNase I 5:1 beträgt (Wilson, 1975), liegt es nahe anzunehmen, daß auch die Kernextrakte neben DNasen auch RNasen enthalten. Aus diesem Grunde wurde zum Nachweis von RNasen im unfraktionierten Kernextrakt 16 S und 23 S rRNA mit Kernextraktprotein (1,6 µg/20µl) inkubiert. Die Produktanalyse nach Elektrophorese in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel zeigt, daß bereits nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei 37 °C die eingesetzte rRNA durch den Extrakt abgebaut wird (Fig. 3, Spur 2). In einem parallelen Ansatz dazu wurde getestet, ob die Vanadylribonukleosid-Komplexe von Adenosin, Guanosin, Uridin und Cytidin (Berger & Birkenmeier, 1979) die im Kernextrakt enthaltenen RNasen inhibieren können. Der Versuch zeigt, daß in Anwesenheit der Vanadylribonukleosid-Komplexe (10 mM) kein Abbau der rRNA erfolgt (Fig. 3, Spur 3).

Folglich sind im Kernextrakt neben DNasen auch RNasen nachzuweisen, welche durch Zusatz eines RNase-Inhibitors inhibiert werden. Der eingesetzte RNase-Inhibitor ist jedoch ein Ribonukleosidanalogon und man kann annehmen, daß die Vanadylribonukleosid-Komplexe als Substratanaloga RNA Polymerase hemmen.

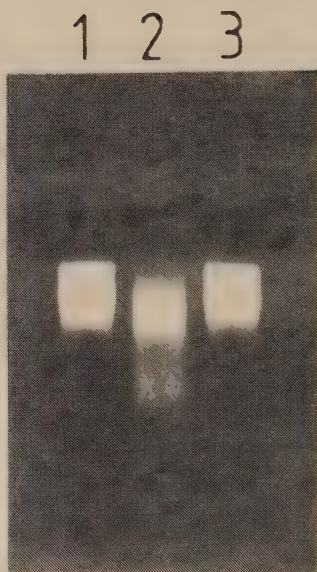


Fig. 3 Gelelektrophoretische Analyse des Tests auf RNasen im Kernextrakt mit 16 und 23 S rRNA

Je 2 μg 16 und 23 S rRNA wurden in einem Endvolumen von 20 μl mit 1 μl (1,6 μg) Kernextrakt in An- oder Abwesenheit der Vanadylribonukleosid-Komplexe von Adenin, Guanin, Cytidin und Uracil fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Die gelelektrophoretische Analyse erfolgte in einem 0,8%igen Agarosegel.

- 1 16 und 23 S rRNA ohne Kernextrakt und mit 10 mM Vanadylribonukleosidkomplexe
- 2 16 und 23 S rRNA mit 1,6 μg Kernextrakt ohne Vanadylribonukleosidkomplexe
- 3 16 und 23 S rRNA mit 1,6 μg Kernextrakt und mit 10 mM Vanadylribonukleosidkomplexe

In einem weiteren Experiment wurde daher der Einfluß der Vanadylribonukleosid-Komplexe auf die RNA Polymerase untersucht, da eine Inhibierung der RNA Polymerase einen Nachweis der stimulierenden Aktivität unmöglich macht. Das Experiment mit RNA Polymerase II aus Weizenkeimen zeigt, daß die Vanadylribonukleosid-Komplexe die RNA Polymerase Aktivität vollständig inhibieren (Tab. 1). Diese Komplexe können daher als RNase-Inhibitor nicht zum Kernextrakt zugesetzt werden, da sie gleichzeitig endogene bzw. dem Ansatz zugesetzte RNA Polymerase inhibieren.

RNA Polymerase II	Aktivität (pmol/30 min)
ohne Vanadylribonukleosid-Komplexe	10,1
mit Vanadylribonukleosid-Komplexe	0

Tab. 1 Einfluß von Vanadylribonukleosid-Komplexen auf die RNA Polymerase-Aktivität von Weizenkeimen

In einem 30 µl Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) wurden jeweils 0,6 µg RNA Polymerase II aus Weizenkeimen mit oder ohne 10 mM Vanadylribonukleosid-Komplexe 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Gesamt-RNA-Synthese wurde anschließend durch aufsteigende Chromatographie auf Whatmann 3MM Papier, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt. Die Einbaureate von (α -³²P)UTP in Abwesenheit der Vanadylkomplexe betrug 424245 cpm/30 min.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß im unfraktionierten Kernextrakt keine Proteasen nachgewiesen werden konnten, jedoch DNasen und RNasen als störende Fremdaktivitäten vorhanden sind, welche eine Reinigung der stimulierenden Aktivität erfordern.

Anreicherung der stimulierenden Aktivität

BESTIMMUNG DER STIMULIERENDEN AKTIVITÄT

Eine Anreicherung der stimulierenden Aktivität aus Kernextrakten ist aus folgenden drei Gründen notwendig:

1. Abtrennung von störenden Fremdaktivitäten, wie DNasen und RNasen.
2. Abtrennung von endogener Tabak RNA Polymerase, um die stimulierende Aktivität auf RNA Polymerase überhaupt nachweisen zu können und
3. Erhöhung der spezifischen Aktivität.

Um die stimulierende Aktivität überhaupt anreichern zu können, ist es notwendig, sie quantitativ messen zu können.

In einem Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) wird in Anlehnung an Jendrisak und Burgess (1975) die Gesamteinbaurate, gemessen in der Einheit 1 pmol/15 min, von (α - ^{32}P)UMP in α -Amanitin-hemmbar und durch RNase A abbaubare radioaktive hochmolekulare Produkte bestimmt. Eine Erhöhung dieser Gesamteinbaurate, welche nach Zugabe von Kernextrakt beobachtet wird, wird als stimulierende Aktivität bezeichnet. Die stimulierende Aktivität (S) ergibt sich somit aus der Differenz der Gesamteinbauraten von (α - ^{32}P)UTP in radioaktiv hochmolekulare Produkte in Anwesenheit von RNA Polymerase mit Kernextrakt (G) und in Anwesenheit von RNA Polymerase ohne Kernextrakt (P):

$$S = G - P \quad (\text{pmol}/15 \text{ min} \cdot \mu\text{l})$$

Der Stimulierungsfaktor (F) errechnet sich wie folgt:

$$F = \frac{G}{P}$$

Im allgemeinen können die gemessenen Werte für die stimulierende Aktivität (S) nicht direkt miteinander verglichen werden, da die eingesetzten RNA Polymerasepräparate aus unterschiedlichen Enzymanreicherungen stammen und somit unterschiedliche Aktivitäten (P) besitzen. Aus diesem Grunde wird die Aktivität jeder RNA Polymerasepräparation (P) auf den Wert 10 pmol/15 min normiert. Die mit der verwendeten RNA Polymerasepräparation (P) gemessene Gesamtaktivität von RNA Polymerase mit Kernextrakt (G) wird anschließend um den Normierungsfaktor korrigiert. Durch diese Rechenoperation können alle Werte für die stimulierende Aktivität (S) miteinander direkt verglichen werden. Der Stimulierungsfaktor (F) ändert sich durch die Normierung natürlich nicht. Der über alle Meßreihen gemittelte Variationskoeffizient der Ergebnisse für die RNA Polymerase Aktivität als ein "Maß für die Unpräzision der Messung" (Stähler, 1977) betrug $3,9 \pm 1,5\%$.

HERSTELLUNG DES KERNEXTRAKTS

Extraktion intakter Kerne

Zur Gewinnung der stimulierenden Aktivität aus Zellkernen mußten diese zuerst in möglichst unversehrter, mikroskopisch intakter Form gewonnen werden. Abweichend von einem Verfahren nach Willmitzer und Wagner (1981) wurden die gewonnenen Tabakzellen $1\frac{1}{2}$ Stunden statt $\frac{1}{2}$ Stunde mit Pectinase und Cellulase in Puffer B (siehe Material und Methoden) inkubiert. Nach dieser verlängerten Inkubationszeit konnten die Zellen anschließend mit dem Ultra-turrax leichter mechanisch aufgebrochen werden (siehe Material und Methoden). Auf diese Weise vermied man, daß durch zu starkes Homogenisieren der Zellsuspension kleinste Zellfragmente entstehen, die von den Zellkernen nur schwer abtrennbar sind. Ferner hat sich das Homogenisieren tiefgefrorener Tabakzellen im Mörser nach Murray und Thompson (1980) nicht bewährt, da bei diesem Verfahren ebenso kleinste Zellfragmente unvermeidbar entstehen.

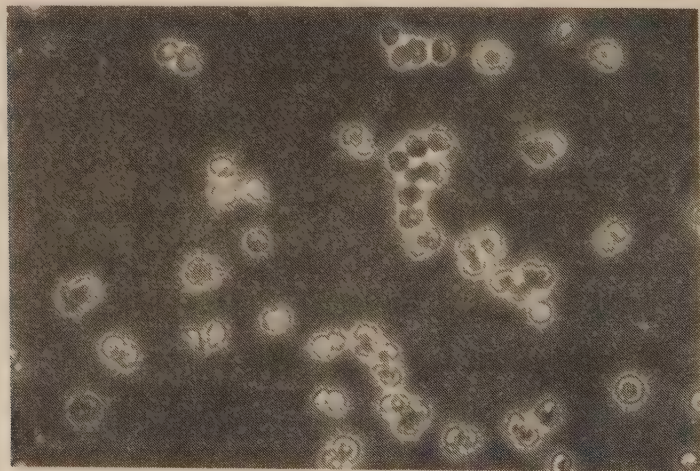


Fig. 4 Phasenkontrastaufnahme hochgereinigter Zellkerne aus N. tabacum (102fache Vergrößerung)

Nach der Isolierung hochgereinigter Zellkerne (Fig. 4) wurden diese nach einem modifizierten Verfahren von van der Linde et al. (1984) in einem Kernstabilisierungspuffer mit 0,35M NaCl (siehe Material und Methoden) vorsichtig bei 4 °C eine Stunde lang geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation bei niedriger Umdrehungszahl (siehe Material und Methoden) abgetrennt. Durch Verwendung eines Kernstabilisierungspuffers blieben die Kerne während der Extraktion intakt und es konnten nur Proteine extrahiert werden, welche unter den angegebenen Bedingungen die Kernmembran passieren können. Der auf diese Weise gewonnene klar zentrifugierte Überstand (1.1 ml) enthält bei einer Extraktion von ca. $1,8 \cdot 10^6$ Kernen rund 0,8 mg Protein. Sowohl RNA Polymerase-Aktivität (Tab. 2a), als auch DNA-Bindeaktivität (Tab. 2b)) konnten im anschließenden Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) bzw. im Nitrocellulose-Bindungstest (siehe Material und Methoden) nachgewiesen werden. Ferner besteht die RNA Polymerase-Aktivität zu 35% aus einer α -Amanitin sensitiven Aktivität und zu 65% aus einer durch α -Amanitin (1 μ g/ml) nicht-inhibierbaren Aktivität. Die Ergebnisse zeigen, daß mit diesem Verfahren zur Kernextraktion kernspezifische Proteine wie RNA Polymerase und DNA-Bindeproteine aus den Zellkernen gewonnen werden können.

	RNA Polymerase-Aktivität in Kernextrakt (pmol/2 h)
+ α -Amanitin	9,1
- α -Amanitin	14,1

Tab. 2a Nachweis von RNA Polymerase Aktivität im Kernextrakt

In einem 60 μ l Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) wurden 3,0 μ g Extraktproteine und 0,2 o.d.260/ml polyd(A-T)·d(A-T) mit oder ohne 1 μ g/ml α -Amanitin zwei Stunden lang bei 30 °C inkubiert. Die synthetisierte Gesamt-RNA wurde anschließend durch aufsteigende Chromatographie auf Whatman 3MM Papier, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt. Die Einbaurate von (α - 32 P)UTP in Abwesenheit von α -Amanitin betrug 273280 cpm/2h.

	Protein-DNA-Bindeaktivität (cpm)
Leerwert	201
Kernextrakt	1637

Tab. 2b Nachweis von Protein-DNA-Bindeaktivität im Kernextrakt

In einem Protein-DNA-Bindepuffer (siehe Material und Methoden) wurden je 36 ng eines ^{32}P -endmarkierten 1226 bp langen DNA-Fragments des Chalconsynthasegens ($1,2 \times 10^5$ cpm/ μg bzw. 96 PBq/mol) 15 Minuten bei 25 °C in An- oder Abwesenheit von 3,2 μg Kernextrakt inkubiert. Die Salzkonzentration im Ansatz betrug 0,18 M NaCl. Anschließend wurden die Ansätze durch eine alkalibehandelte Nitrocellulosemembran (siehe Material und Methoden) filtriert und mit 0,15 M NaCl-Bindepuffer nachgewaschen. Die Radioaktivität am Filter wurde in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen.

Extraktion aufgebrochener Zellkerne

Findet man in bereits extrahierten und intakten Kernen noch stimulierende Aktivität? Zur Beantwortung dieser Frage wurden bereits extrahierte Kerne in 0,05 M Tris-Cl-Extraktionspuffer mit 0,35M NaCl suspendiert und mit der Parrbombe (siehe Material und Methoden) aufgebrochen. Zum Nachweis der stimulierenden Aktivität mußte das klarzentrifugierte Filtrat zur Abtrennung von endogener RNA Polymerase-Aktivität weiter über eine DEAE-Sepharose-Säule fraktioniert und mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konzentriert werden (siehe Material und Methoden). Ebenso wurde der Kernextrakt aus intakten Zellkernen über eine DEAE-Sepharose-Säule mit anschließender Ammoniumsulfatfällung fraktioniert. Ein Vergleich der stimulierenden Aktivitäten beider Anreicherungen ergibt, daß

- a) in bereits extrahierten Kernen immer noch knapp dreimal soviel Gesamtaktivität vorhanden ist wie in intakten Kernen und
- b) die spezifische stimulierende Aktivität von Kernextrakt aufgebrochener Kerne sogar noch größer ist als die spezifische Aktivität von Kernextrakt intakter Kerne, was wiederum einen größeren Stimulierungsfaktor ergibt (Tab. 3).

Zur Gewinnung der stimulierenden Aktivität aus Zellkernen wurden daher die Kerne bei allen weiteren Versuchen in 0,35 M NaCl Extraktionspuffer (siehe Material und Methoden) mit der Parrbombe aufgebrochen.

fraktionierter Extrakt	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Gesamt- protein (mg)	stimulierende Aktivität (pmol/15min. μ l)	Gesamt- aktivität (pmol/15min)	spezifische Aktivität (pmol/15min. μ g)	Stimulierungs- faktor
aus intakten Zellkernen	0,10	0,35	0,035	1,7	170	4,9	2,7
aus aufgebrochenen Kernen	0,11	0,52	0,057	4,5	495	8,5	3,9

Tab. 3 Vergleich von fraktionierten Kernextrakten aus intakten und aus aufgebrochenen Zellkernen

Hochgereinigte mikroskopisch unversehrte Zellkerne wurden nach einem modifizierten Verfahren nach Willmitzer und Wagner (1981) (siehe Material und Methoden) gewonnen und anschließend eine Stunde in 1 ml Kernstabilisierungspuffer mit 0,35 M NaCl bei 0 °C extrahiert. Der klartrifugierte Überstand wurde auf eine DEAE-Sepharosesäule gegeben und das 0,18 M NaCl-Eluat mit Ammoniumsulfat gefällt. Der zentrifugierte Niederschlag wurde anschließend in 0,1 ml 0,1 M NaCl-Lagerpuffer wie in Material und Methoden beschrieben gelöst. Die stimulierende Aktivität von 2,4 μ g fraktioniertem Extrakt wurde in einem Standardtranskriptionsansatz mit RNA Polymerase aus Weizenkeimen und 0,28 μ g eines 1226 bp langen DNA-Fragments des Chalconsynthasegens gemessen (siehe Material und Methoden). Die Einbaureate von (α -³²P)UTP ohne Extrakt betrug 443832 cpm/15 min. Dieselben Zellkerne wurden nach der Extraktion wiederum in 1 ml Kernstabilisierungspuffer mit 0,35 M NaCl suspendiert und in die Parrbombe eingefüllt. Nach einer Äquilibrierzeit von einer Stunde bei 115 atm im Kühlraum wurde die Parrbombe vorsichtig am Reduzierventil geöffnet und die gewonnene Extraktuspension zentrifugiert (siehe Material und Methoden). Der klare Überstand wurde anschließend wie oben beschrieben fraktioniert. Die stimulierende Aktivität von 3,4 μ g fraktioniertem Extrakt wurde in einem Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) an einem 1120 bp langem DNA-Fragment des Nopalinsynthasegens gemessen. Die Einbaureate von (α -³²P)UTP ohne Extrakt betrug in diesem Fall 106002 cpm/15 min

CHROMATOGRAPHIE AN DEAE-SEPHAROSE

Zur Abtrennung von endogener Tabak RNA Polymerase mußte der Kern-extrakt (5.0 mg), nachdem er mit Elutionspuffer (ohne NaCl) auf ca. 0.2 M NaCl verdünnt worden war, über eine DEAE-Sepharose-Säule ($0,8 \text{ cm}^2 \times 8 \text{ cm}$) fraktioniert werden. Das Volumen der verdünnten Probe darf jedoch nicht mehr als 2 ml betragen, da sonst bei der Elution die stimulierende Aktivität im 0,05 M NaCl Eluat (Säulendurchfluß) zu sehr verdünnt wird. Es wurden vier Salzeluate mit stufenweise ansteigender NaCl-Konzentration (0,05 M, 0,25 M, 0,35 M und 1,0 M NaCl) gewonnen (Fig. 5). Auf eine Elution bei 0,15 M NaCl wurde verzichtet, da in einem Vorversuch bei einer Elution mit 0,15 M NaCl kein Anstieg der Absorption bei 280 nm beobachtet wurde. Eluiert man mit stufenweise steigender Ammoniumchlorid-Konzentration, so beobachtet man in der Absorption bei 280 nm weniger scharfe Elutionsprofile als mit NaCl. Daher wurde immer NaCl im Elutionspuffer verwendet.

Bei der Elution mit 0,05 M NaCl wird im Absorptionsprofil bei 280 nm reproduzierbar eine sehr breite Bande beobachtet (Fig. 5), welche durch Überlagerung zweier Elutionsgipfel entstanden sein könnte. Testet man nun jede Fraktion der breiten Bande auf stimulierende Aktivität (Fig. 6), so zeigt das Aktivitätsprofil einen ähnlich breiten Verlauf wie das Absorptionsprofil bei 280 nm mit dem Unterschied, daß zwei Aktivitätsmaxima deutlich zu erkennen sind. Im Gegensatz zum zweiten Aktivitätsmaximum befindet sich das erste Aktivitätsmaximum um ca. eine Fraktion vor dem

Fig. 5 Chromatographie von Kernextrakt an DEAE-Sepharose

Ein aus $2 \cdot 10^8$ Kernen gewonnener und mit Elutionspuffer (ohne NaCl) auf 0,2 M NaCl verdünnter Kernextrakt (5,0 mg/1,05 ml) wurde auf eine DEAE-Sepharose CL 6B Säule gegeben und mit NaCl-Elutionspuffer eluiert (siehe Material und Methoden). Die NaCl-Konzentration im Elutionspuffer wurde stufenweise von 0,05 M auf 1 M NaCl erhöht und die Absorption der Eluate bei 280 nm mit einem Durchflußphotometer gemessen. Zur Messung der RNA Polymerase Aktivität wurden je Fraktion der 0,25 M und 0,35 M NaCl Eluate 50 μ l in einem 120 μ l Standardtranskriptionsansatz mit 0,1 o.d.₂₆₀/ml polyd(A-T)·d(A-T) als DNA-Matrize eingesetzt und zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Die synthetisierte Gesamt-RNA wurde anschließend, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt.

Absorptionsmaximum bei 280 nm. Eine mögliche Erklärung für dieses Elutionsverhalten ist die Elution von verschiedenen stimulierenden Faktoren, welche unter diesen Elutionsbedingungen nicht vollständig getrennt werden können. Eine weitere Erklärung für dieses Elutionsverhalten ist das Auftragen des Extrakts auf die Säule mit einer Salzkonzentration von ca. 0,2 M NaCl. Das Eluieren hingegen wird mit einem 0,05 M NaCl Elutionspuffer durchgeführt. Dadurch kann sich ein Salzgradient innerhalb der Säule ausbilden, der zu dem beobachteten Elutionsprofil führen könnte. Aus diesem Grund wurden bei allen Anreicherungen die einzelnen Fraktionen des 0,05 M NaCl Eluates zu einer oder zu zwei Fraktionen vereinigt, welche als 0,05 M NaCl Eluate der DEAE-Chromatographie bezeichnet wurden.

RNA Polymerase Aktivität wird bei den meisten Anreicherungen im 0,25 M NaCl Eluat gefunden und nur selten im 0,35 M NaCl Eluat (Fig. 5). Im vereinigten 0,05 M NaCl Eluat wird keine RNA Polymerase Aktivität gefunden (ohne Beleg). Die aktiven Polymerasefraktionen wurden vereinigt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

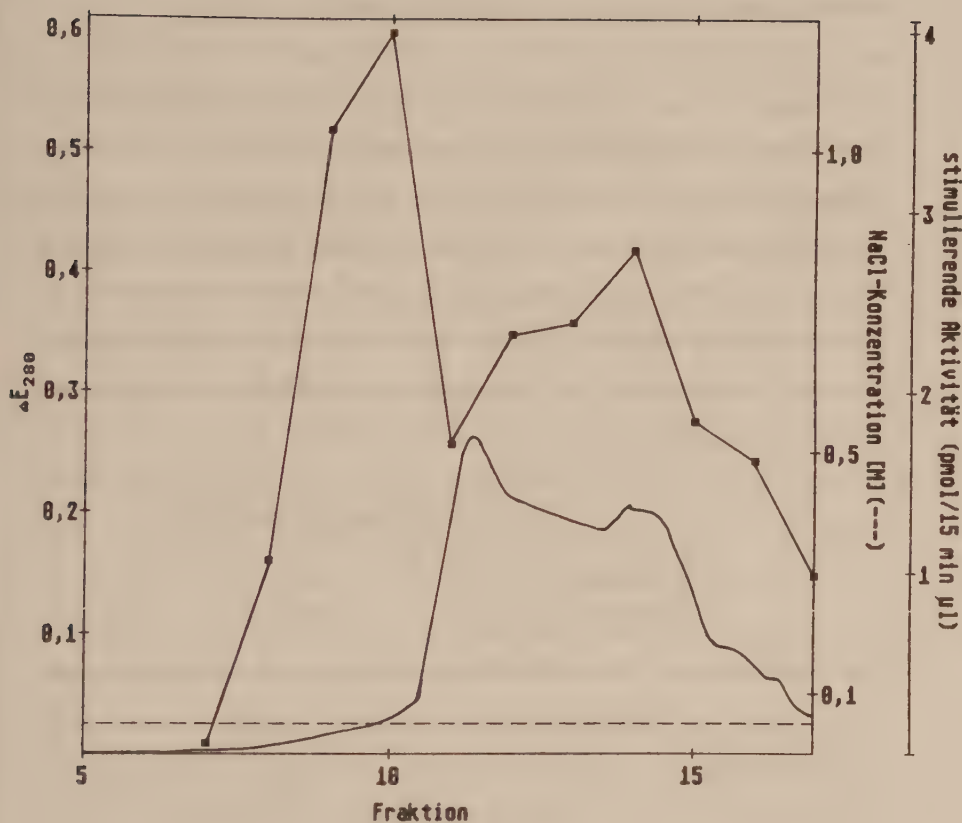


Fig. 6 Nachweis der stimulierenden Aktivität im 0,05 M NaCl Eluat einer DEAE-Sepharose Chromatographie

Ein aus $5 \cdot 10^7$ Kernen gewonnener und mit Elutionspuffer (ohne NaCl) auf 0,19 M NaCl verdünnter Kernextrakt (5,0 mg/2,3 ml) wurde auf eine DEAE-Sepharose Säule gegeben und mit 0,05 M NaCl Elutionspuffer eluiert (siehe Material und Methoden). Die Absorption des Eluats wurde bei 280 nm gemessen und je 30 μ l der Fraktionen in einem Standardtranskriptionsansatz mit 0,08 o.d.₂₆₀/ml polyd(A-T)-d(A-T) als DNA-Matrize auf stimulierende Aktivität getestet (siehe Material und Methoden).

PROTEINFRAKTIONIERUNG MIT AMMONIUMSULFAT

Zur Konzentrierung und weiteren Fraktionierung wurde das vereinigte 0,05 M NaCl Eluat der DEAE-Chromatographie mit Ammoniumsulfat (65%ige Sättigungskonzentration, siehe Material und Methoden) gefällt. Anschließend wurden in einem Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) bzw. in einem Nitrocellulose-Bindungstest (siehe Material und Methoden) im ammoniumsulfatgefällten Niederschlag sowohl eine stimulierende Aktivität (Tab. 5), als auch eine DNA-bindende Aktivität (Tab. 4) nachgewiesen.

	Protein-DNA-Bindeaktivität (cpm)
Leerwert	111
frkt. Extrakt	1286

Tab. 4 Nachweis von Protein-DNA-Bindeaktivität im fraktionierten Kernextrakt

In einem Protein-DNA-Bindepuffer (siehe Material und Methoden) wurden je 36 ng eines ^{32}P -endmarkierten 1226 bp langen DNA-Fragments des Chalconsynthasegens ($1,2 \times 10^5$ cpm/ μg bzw. 96 PBq/mol) 15 Minuten bei 25 °C in An- oder Abwesenheit von 1,4 μg eines ammoniumsulfatgefällten 0,1 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze durch eine alkalibehandelte Nitrocellulosemembran (siehe Material und Methoden) filtriert und mit 0,15 M NaCl-Bindepuffer nachgewaschen. Die Radioaktivität am Filter wurde in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen.

Ferner werden durch eine Fällung mit Ammoniumsulfat (65%ige Sättigung) der größte Teil an Fremdaktivitäten, wie DNase (siehe "Prüfung auf *nicking*-Aktivität", Seite 103) abgetrennt. Bei der Prüfung auf Sensitivität gegenüber Proteasen im Kernextrakt konnte ein Verschwinden der stimulierenden Aktivität nach Zusatz von Proteinase K mit einem 0,05 M NaCl Eluat der DEAE-Chromatographie nicht beobachtet werden (ohne Beleg). Erst nach einer 65%igen Ammoniumsulfatfällung des 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie (siehe Material und Methoden) wurde ein Verschwinden der stimulierenden Aktivität nach Zusatz von Proteinase K beobachtet (siehe Seite 79). Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß mögliche Proteaseinhibitoren im Überstand der Ammoniumsulfatfällung bleiben und von der stimulierenden Aktivität, die sich im Niederschlag befindet, abgetrennt werden. Die Abtrennung von Fremdaktivitäten war der Hauptgrund der durchgeführten Ammoniumsulfatfällung, obwohl eine Erhöhung des Anreicherungsgrads nicht erzielt wurde (Tab. 5). Die nach der DEAE-Chromatographie mit Ammoniumsulfat gefällte stimulierende Aktivität wurde bei den meisten Versuchen eingesetzt. Es bleibt jedoch offen, ob die stimulierende Aktivität aus einem oder aus mehreren stimulierenden Faktoren zusammengesetzt ist.

Anreicherungs-schritt	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Gesamt- protein (mg)	stimulierende Aktivität (pmol/15min.µl)	Gesamt- aktivität (pmol/15min)	Ausbeute (%)	spezifische Aktivität (pmol/15min.µg)	Anreicherungs- grad
ernnextrakt	1,05	4,8	5,00	5,9	(6.195)	100	3,7	—
DEAE-Sephrose	8,40	0,08	0,66	0,7	5880	95	9,9	2,7
Ammoniumsulfatfällung	0,20	0,34	0,07	3,3	660	11	9,6	2,6

Tab. 5 Zusammenfassung der Anreicherung der simulierenden Aktivität über DEAE-Sephrose-
chromatographie und mit Ammoniumsulfatfraktionierung

CHROMATOGRAPHIE AN KATIONENAUSTAUSCHERN

Heparinsepharose

In einem Vorversuch zeigte sich, daß die stimulierende Aktivität an Heparin-Sepharose CL6B bindet. Daher wurden zur Fraktionierung der stimulierenden Aktivität 0,94 ml (0,07 mg) eines 0,05 M Eluats einer DEAE-Chromatographie auf eine Heparin-Sepharose Säule CL6B ($0,38 \text{ cm}^2 \times 4,5 \text{ cm}$) gegeben und nach dem Einziehen der stimulierenden Aktivität bei 4°C eine Stunde lang zum Binden an das Säulenmaterial in der Säule belassen. Anschließend wurde die Säule mit 0,05 M NH_4Cl Elutionspuffer (siehe Material und Methoden) solange eluiert, bis die Absorption bei 280 nm den ursprünglichen Wert wieder erreicht hatte. Zur Vermeidung einer Verdünnung wurde in einem "batch"-ähnlichen Verfahren (Pharmacia, 1979) dann die Säule trocken gepumpt und anschließend mit 0,5 ml 1,0 M NH_4Cl Elutionspuffer eine halbe Stunde lang stehen gelassen. Dann wurde die Säule mit 1,0 M NH_4Cl Elutionspuffer eluiert, die vereinigten 0,05 M NH_4Cl - (2,3 ml) und 1,0 M NH_4Cl -Eluate (0,9 ml) über Nacht gegen 0,05 M NaCl -Elutionspuffer (siehe Material und Methoden) dialysiert und in einem Standardtranskriptionsansatz auf stimulierende Aktivität getestet.

Das Ergebnis der Aktivitätstests war, daß im Gegensatz zum 0,05 M NH_4Cl Eluat im 1,0 M Eluat stimulierende Aktivität nachgewiesen werden konnte (Tab. 6). Jedoch ließ sich die stimulierende Aktivität durch eine Verdoppelung der Proteinmenge im Aktivitätstest nicht weiter erhöhen, sondern sank sogar über 80% auf 0,3 pmol/15 min· μl , obwohl das 1,0 M NH_4Cl Eluat gegen 0,05 M NaCl Elutionspuffer (siehe Material und Methoden) dialysiert wurde. Wird die geringere Proteinmenge von 0,13 μg zur Berechnung des Anreicherungsfaktors herangezogen, so kann durch Chromatographie an Heparin-Sepharose eine zwei- bis dreifach höhere Anreicherung über die Anreicherung durch die Chromatographie an DEAE-Cellulose erzielt werden. Eine Elution der Heparin-Sepharosesäule mit einem NaCl-Stufengradienten in 0,05 M NaCl Schritten erbrachte bei einem weiteren Fraktionierungsversuch keine Verbesserung der Anreicherung.

Anreicherungs-schritt	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Gesamt- protein (mg)	stimulierende Aktivität (pmol/15min· μ l)	Gesamt- aktivität (pmol/15min)	spezifische Aktivität (pmol/15min· μ g)	Anreicherungs- grad
Rohextrakt	1,85	30,00	31,50	n.b.	n.b.	n.b.	—
DEAE-Sepharose	9,23	0,07	0,65	2,3	21229	32,4	—
Heparin-Sepharose	22,60	0,007	0,16	0	0	0	0
0,05 M NH_4Cl Eluat	8,80	0,025	0,22	2,0	17600	81,6	2,5
1,00 M NH_4Cl Eluat							

n.b. nicht bestimmt

Tab. 6 Zusammenfassung der Anreicherung der stimulierenden Aktivität über DEAE- und Heparin-Sepharosechromatographie

Phosphocellulose

Es wurden in Anlehnung an Matsui et al. (1980) auch Versuche unternommen, die stimulierende Aktivität nach der DEAE-Chromatographie an Phosphocellulose zu binden. Hierzu wurde ein Mobicoll-Säulchen (Fa. mobitec GmbH; Durchmesser: 7 - 8 mm) 14 mm hoch mit regenerierter Phosphocellulose (Whatman P11, siehe Material und Methoden) gefüllt und mit 0,05 M NaCl Elutionspuffer (siehe Material und Methoden) äquilibriert. Anschließend wurden 80 μ l (5,6 μ g) des 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie auf die Säule aufgetragen und fünf Minuten in Eis belassen. Die aufgetragene Fraktion wurde in einer Sigma-Zentrifuge (max. 1500 g) durch die Säule zentrifugiert und das aufgefangene Eluat erneut auf die Säule aufgetragen und durchzentrifugiert. Danach wurde die Säule zweimal mit je 50 μ l 0,15 M, 0,6 M und 1,0 M NaCl Elutionspuffer gespült (Sigma-Zentrifuge, max. 1500 g) und die vereinigten Eluate in einer Tropfendialyseapparatur (microdiscs, Fa. Millipore) 2 $\frac{1}{2}$ bis 3 Stunden gegen 0,05 M NaCl Elutionspuffer dialysiert. Durch die Zentrifugation der Elutionspuffer durch die Säule wurde gewährleistet, daß sich die Elutionsvolumina nicht zu stark verdünnen, denn bei einer zu großen Verdünnung ist die stimulierende Aktivität kaum noch sicher nachweisbar. Nach erfolgter Dialyse wurde jedes Eluat in einem Standardtranskriptionsansatz auf stimulierende Aktivität getestet.

Das Ergebnis der Fraktionierung an Phosphocellulose ist, daß die stimulierende Aktivität an Phosphocellulose bindet und ab einer Salzkonzentration

von 0,15 M NaCl eluiert wird (Tab. 7). Außer im 0,05 M NaCl Eluat wird die stimulierende Aktivität somit in allen Eluaten beobachtet, wobei mit dem 0,6 M NaCl Eluat der größte Stimulierungsfaktor (3,1fach) gemessen wird (Tab. 7). Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß mehrere Faktoren im Kernextrakt eine Stimulierung von RNA Polymerase bewirken, welche durch Chromatographie an Phosphocellulose getrennt werden können. Die stimulierende Aktivität des 0,6 M NaCl Eluats beträgt somit 0,7 pmol/15 min- μ l und ist kleiner als die stimulierende Aktivität nach einer Ammoniumsulfatfällung (Tab. 5) und nach einer Heparinsepharose-Chromatographie (Tab. 6). Leider gab es auch mehrere Versuche, bei denen die stimulierende Aktivität nicht vollständig an Phosphocellulose gebunden wurde, so daß die beschriebenen Ergebnisse nicht in allen Fällen reproduziert werden konnten.

Aktivität von RNA-Polymerase (pmol/15 min) in Anwesenheit von		Stimulierungs- faktor
—	10,0	—
0,05 M NaCl Eluat	11,7	1,2
0,15 M NaCl Eluat	19,5	2,0
0,60 M NaCl Eluat	31,2	3,1
1,00 M NaCl Eluat	21,5	2,2

Tab. 7 Stimulierung von RNA Polymerase durch Eluate der Phosphocellulose-Chromatographie

In einer Versuchsreihe wurden je 0,33 μ g des Fragments d des Nopalinsynthasegens in einem 60 μ l Standardtranskriptionsansatz (25 mM NaCl, siehe Material und Methoden) mit je 30 μ l der NaCl Eluate der Phosphocellulose-Chromatographie fünf Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 0,6 μ g RNA Polymerase gestartet und die synthetisierte RNA, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt. Die Gesamteinbaurrate von (α -³²P)UTP durch RNA Polymerase allein betrug 5982 cpm/15 min.

Die einzelnen Schritte der Anreicherung von stimulierender Aktivität und RNA Polymerase Aktivität sind im folgenden Übersichtsdiagramm (Fig. 7) zusammenfassend dargestellt. Für die meisten Versuche wurde das ammoniumsulfatgefällte 0,05 M NaCl Eluat der DEAE-Chromatographie (Weg 1) verwendet. Die Chromatographie an Phosphocellulose wurde in das Diagramm nicht übernommen, da die oben beschriebenen Ergebnisse nicht in allen Fällen reproduzierbar sind. Dafür wurde die in diesem Kapitel nicht beschriebene Chromatographie an Sephadex G50 in das Diagramm mit aufgenommen, da die Gelfiltration als eine weitere Möglichkeit der Fraktionierung der stimulierenden Aktivität im Kapitel "Molmassenbestimmung" (siehe Seite 81) näher beschrieben ist.

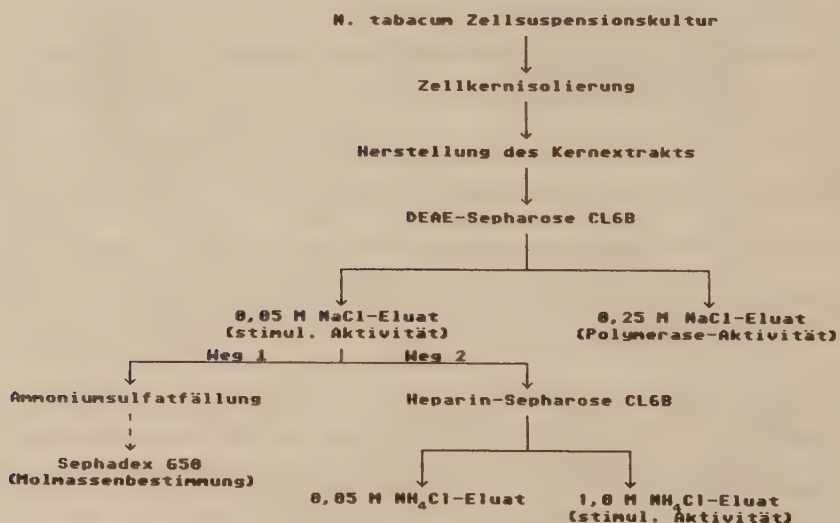


Fig. 7 Übersichtsdiagramm zur Anreicherung der stimulierenden Aktivität

Chemische Natur der stimulierenden Aktivität

NACHWEIS DES PROTEINCHARAKTERS

Hitzeinaktivierung

Zum Nachweis des Proteincharakters durch Hitzeinaktivierung der stimulierenden Aktivität wurden in einer Versuchsreihe jeweils 4 µg des fraktionierten Extrakts fünf Minuten lang bei 55 °C, 75 °C und 98 °C vorinkubiert. Nach dem Abkühlen in Eis und nach Zugabe von Transkriptionsmischung wurde die Reaktion mit RNA-Polymerase aus Weizenkeimen gestartet und die Einbaurrate von (α -³²P)UTP bestimmt (siehe Material und Methoden).

Die Auswertung des Versuchs ergibt, daß ohne vorheriger Hitzeinaktivierung des fraktionierten Kernextrakts RNA Polymerase zweifach stimuliert wird. Diese Stimulierung sinkt jedoch um 50%, wenn der Kernextrakt bei 55 °C vorinkubiert wird und bei 98 °C ist eine Stimulierung nicht mehr nachweisbar (Fig. 8).

Diese Versuchsreihe zeigt, daß die stimulierende Aktivität bereits durch eine Erhöhung der Vorinkubationstemperatur auf 55 °C die Hälfte ihrer Aktivität verliert und mit steigender Temperatur linear bis zur völligen Inaktivierung abnimmt. Die stimulierende Aktivität kann also durch Hitze inaktiviert werden und ist somit ein hitzeempfindliches Agens.

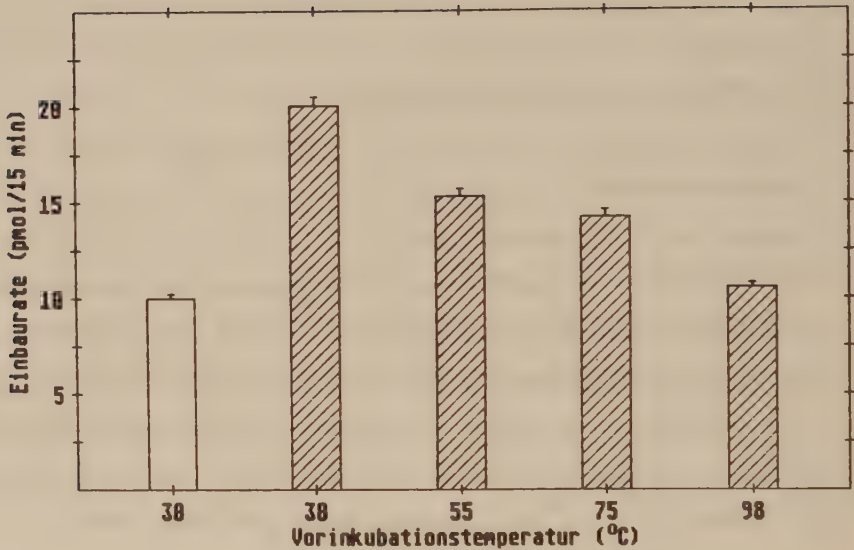


Fig.: 8 Nachweis des Proteincharakters durch Hitzeinaktivierung

In einer Versuchsreihe wurden jeweils 4,2 µg ammoniumsulfatgefälltes 0,18 M NaCl Eluat der DEAE-Säulenchromatographie im 2 µl Ansatz fünf Minuten bei 55 °C, 75 °C und 98 °C vorinkubiert. Nach Abschrecken der Ansätze in Eis wurde eine Transkriptionsmischung (siehe Material und Methoden), welche jeweils 346 ng des DNA-Fragments d vom Nopalinsynthesegen enthält, dazugegeben und fünf Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Zusätzlich zu diesen Ansätzen mit hitzedenaturiertem fraktioniertem Kernextrakt wurde ein Ansatz mit fraktioniertem Kernextrakt ohne vorherige Hitzebehandlung und ein Ansatz ohne fraktioniertem Kernextrakt (Leersäule) bei 30 °C fünf Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden die Transkriptionsreaktionen in einem 30 µl Ansatz mit RNA Polymerase aus Weizenkeimen gestartet und nach 15 Minuten die synthetisierte Gesamt-RNA quantitativ bestimmt (siehe Material und Methoden). Die RNA Polymerase Aktivität ohne fraktionierten Kernextrakt betrug 50145 cpm/15 min und die stimulierende Aktivität 5,0 pmol/15 min·µl.

Proteasesensitivität

Der aussagekräftigste Beweis des Proteincharakters der stimulierenden Aktivität ist die Inaktivierung durch Inkubation mit einer Protease. Für dieses Experiment wurde die Proteinase K gewählt, da diese unspezifisch Proteine hydrolysiert und für den anschließenden Aktivitätstest durch Phenylmethylsulfonylfluorid hemmbar ist.

In Anwesenheit von Phenylmethylsulfonylfluorid-inhibierter Proteinase K und fraktioniertem Kernextrakt wird unter den angegebenen Reaktionsbedingungen (siehe Tab. 8) eine fast sechsfache Stimulierung von RNA Polymerase aus Weizenkeimen beobachtet. Wird nun der Kernextrakt vor dem Reaktionsstart mit RNA Polymerase durch Proteinase K hydrolysiert und anschließend die Protease mit Phenylmethylsulfonylfluorid inhibiert, so wird innerhalb der Streubreite RNA Polymerase nicht mehr stimuliert (Tab. 8).

Aus diesem Experiment kann man schließen, daß die stimulierende Aktivität im Kernextrakt durch Hydrolyse mit Proteinase K verschwindet. Proteasesensitivität und Hitzeinaktivierung beweisen somit den Proteincharakter der stimulierenden Aktivität im Kernextrakt.

Aktivität von RNA Polymerase (pmol/15 min) in Anwesenheit von		Stimulierungs- faktor
—	10,8	—
fraktionierten Kernextrakt	55,5	5,6
hydrolysierten Kernextrakt	13,4	1,3

Tab. 8 Nachweis des Proteincharakters durch Proteasesensitivität

In einer Versuchsreihe wurden jeweils 2.1 µg ammoniumsulfatgefälltes 0,05 M NaCl Eluat der DEAE-Säulenchromatographie (stimulierende Aktivität: 30.3 pmol/15 min·µl) ohne oder mit 4 µg Proteinase K drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch 13 µg Phenylmethylsulfonylfluorid inhibiert. Der nicht hydrolysierte Ansatz von fraktioniertem Kernextrakt wurde zudem mit Phenylmethylsulfonylfluorid-inhibierter Proteinase K versetzt. Nach Zugabe von Transkriptionsmischung wurde in einem Standardtranskriptionsansatz die RNA-Synthese durch Zugabe von RNA Polymerase aus Weizenkeimen gestartet und nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten bei 30 °C die synthetisierte Gesamt-RNA quantitativ bestimmt (siehe Material und Methoden). Als Bezugswert der stimulierenden Aktivität diente in derselben Versuchsreihe ein Ansatz mit RNA Polymerase und Phenylmethylsulfonylfluorid-inhibierter Proteinase K ohne fraktioniertem Kernextrakt mit der Aktivität von 93300 cpm/15 min).

MOLMASSENBESTIMMUNG

Um eine Abschätzung der relativen Molmasse der stimulierenden Aktivität vornehmen zu können, wurde zuerst der Molmassenbereich durch Ultrafiltration bei verschiedenen Ausschlußgrößen eingengt.

Nach Ultrafiltration von fraktioniertem Kernextrakt durch einen Centricon-10 und einen Centricon-30 Microconcentrator mit einer Ausschlußgröße von 10.000 bzw. 30.000 wurden jeweils zwei Fraktionen erhalten, ein Filtrat und ein Konzentrat. Beide Fraktionen wurden in einem Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) auf stimulierende Aktivität geprüft.

Das Ergebnis der Versuche war, daß das Konzentrat der Centricon-10 Ultrafiltration im Gegensatz zum inhibierend wirkenden Filtrat bei gleicher Proteinmenge RNA Polymerase zweifach stimuliert (Tab. 9). Bei der Centricon-30 Ultrafiltration beobachtet man, daß beide Fraktionen, Konzentrat und Filtrat, RNA Polymerase ohne signifikanten Unterschied stimulieren (Tab. 9).

Die stimulierende Aktivität besitzt somit eine relative Molmasse zwischen 10.000 und 30.000.

Aktivität von RNA Polymerase (pmol/15 min) in Anwesenheit von		Stimulierungs- faktor
—	10,0	—
Centricon-10		
-Filtrat	7,3	0,7
-Konzentrat	19,8	2,0
Centricon-30		
-Filtrat	23,9	2,4
-Konzentrat	15,8	1,6

Tab. 9 Ultrafiltration mit Centricon Mikrokonzentratoren

150 µl (450 µg Protein) eines ammoniumsulfatgefällten 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Säulenchromatographie (stimulierende Aktivität: 11,8 pmol/15 min·µl) wurde eine halbe Stunde bei 3000g in einem Centricon-10 Mikrokonzentrator filtriert. Jeweils 1,6 µg Filtrat und Konzentrat sind anschließend in einem Standardtranskriptionsansatz auf stimulierende Aktivität geprüft worden (siehe Material und Methoden).

180µl (380 µg Protein) des um das 1,5fache mit Elutionspuffer verdünnten Konzentrats der Centricon-10 Ultrafiltration wurde 45 Minuten bei 3000g durch einen Centricon-30 Mikrokonzentrator filtriert. Anschließend wurden jeweils 2,1 µg von Filtrat und Konzentrat in einem Standardtranskriptionsansatz auf stimulierende Aktivität geprüft (siehe Material und Methoden). Die Einbautraten von (α -³²P)UTP in Abwesenheit der fraktionierten Extrakte betrugen 117042 cpm/15 min bzw. 84486 cpm/15 min.

Weil der bei diesen Versuchen verwendete Kernextrakt auch für die Isolierung von RNA Polymerase aus Tabakzellkernen nach Szopa und Wagner (1984) verwendet worden war, wurde er abweichend von der in Material und Methoden beschriebenen Herstellung von Kernextrakt auf folgende Weise hergestellt:

Nach Aufschluß von 700 g in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Tabakzellen nach Murray und Thompson (1980) wurden die Zellkerne nach der modifizierten Methode von Willmitzer und Wagner (1981) gereinigt (siehe Material und Methoden). Anschließend wurden die Zellkerne in 28 ml Puffer A (0,14 M NaCl) suspendiert und eine Minute mit Ultraschall im Eisbad beschallt. Die Temperatur stieg hierbei auf ca. 40 °C. Anschließend wurde unter Rühren 9 g (NH₄)₂SO₄ zu einem Gesamtvolumen von 30 ml (30% w/v) dazugegeben und 80 Minuten unter Rühren im Eis belassen. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 48000g wurde der Überstand in 4 ml Puffer A aufgenommen und über Nacht gegen Puffer B (0,05 M NaCl) bei 4 °C dialysiert. Neben NaCl enthielten Puffer A und B noch 50 mM Tris·Cl (pH7,9), 1 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,1 mM PMSF und 20% (v/v) Glycerin (Szopa & Wagner, 1984). 3,7 ml des auf diese Weise gewonnenen Kernextrakts wurden wie in Material und Methoden beschrieben über eine DEAE-Säule fraktioniert und das 0,05 M NaCl Eluat mit Ammoniumsulfat gefällt.

Bei einer relativen Molmassenbestimmung der stimulierenden Aktivität an Sephadex G50 erscheint das Maximum der stimulierenden Aktivität zwischen der Fraktion von Cytochrom c und Aprotinin (Fig. 9A). Eine genaue Auswertung der Elutionsprofile ergibt eine Molmasse der stimulierenden Aktivität von 10.000 (Fig. 9B).

Es ist wichtig zu erwähnen, daß die stimulierende Aktivität nicht über den gesamten Bereich beobachtet wird, sondern das Maximum der stimulierenden Aktivität erscheint in einem engen charakteristischen Bereich in der Gelfiltration mit einer definierten Molmasse. Bemerkenswert ist, daß im abfallenden Bereich der Absorption bei 280 nm reproduzierbar eine Inhibierung von RNA Polymerase bis 40% festgestellt wird. Dies weist darauf hin, daß im Kernextrakt RNA Polymerase hemmende Proteine mit einer relativen Molmasse größer als 25000 vorkommen.

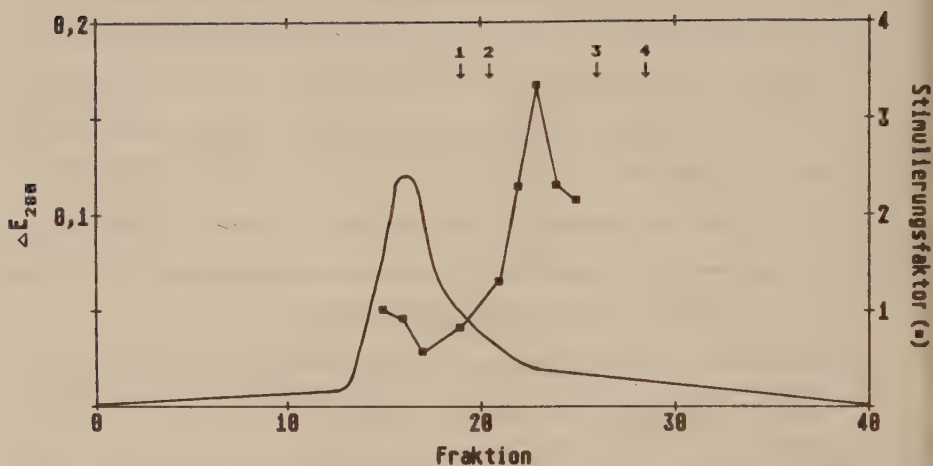


Fig. 9A Gelfiltration von stimulierender Aktivität und Eichproteinen an Sephadex G50

25 μ l (75 μ g Protein) eines ammoniumsulfatgefällten 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Säulenchromatographie (stimulierende Aktivität: 11,8 pmol/15 min· μ l) wurde auf eine Sephadex G50 Säule (175×3 mm) aufgetragen und mit 0,05 M NaCl Elutionspuffer (siehe Material und Methoden) eluiert (1,8 ml/h). Während der Elution sind Fraktionen mit je einem Tropfen (ca. 50 μ l) gesammelt worden. Anschließend wurden jeweils 20 μ l Aliquots der Fraktionen in einem Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) auf stimulierende Aktivität geprüft (■). Von den Eichproteinen Chymotrypsinogen (25.000) (1), Cytochrom c (12.500) (2), Aprotinin (6.500) (3) und Insulin Kette B (3.400) (4) wurden bei Chymotrypsinogen und Cytochrom c jeweils 60 μ g (15 μ l), bei Aprotinin 20 μ g (40 μ l) und bei Insulin Kette B 90 μ g (10 μ l) getrennt auf die Säule aufgetragen und unter den gleichen Bedingungen mit 0,05 M NaCl Tris·Cl-Puffer eluiert. Die Elutionsprofile der Eichproteine wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm im Durchflußphotometer verfolgt und daraus das jeweilige Elutionsmaximum bestimmt (↓). Im Unterschied zu der in Material und Methoden beschriebenen Herstellung von Kernextrakt wurde der gleiche fraktionierte Kernextrakt verwendet wie auf Seite 82 beschrieben.

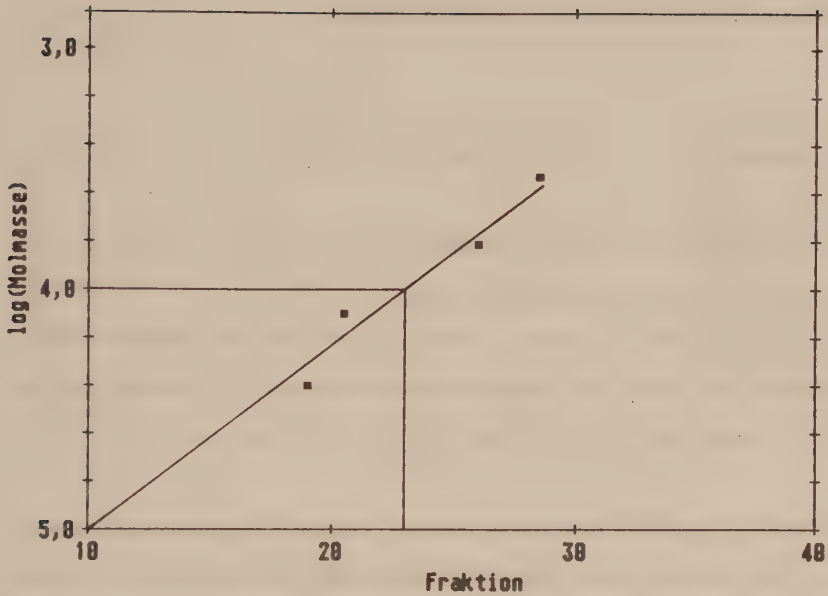


Fig. 9B Halb-logarithmisches Diagramm der Elutionsmaxima der Gelfiltration

Der Logarithmus der Molmasse der Eichproteine wurde gegen die Fraktionen der Elutionsmaxima aufgetragen. Die Molmasse der stimulierenden Aktivität wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate errechnet. Der Korrelationskoeffizient der Eichgeraden beträgt 0,98 und der durchschnittliche Fehler der Eichproteine wurde zu $23 \pm 8\%$ aus den Elutionsprofilen errechnet. Aus der Normalverteilung der Elution der stimulierenden Aktivität ergibt sich mit 68%iger Wahrscheinlichkeit ein Molmassenbereich von 7.600 bis 13.200.

Charakterisierung der stimulierenden Aktivität

ABHÄNGIGKEIT VON DER PROTEINKONZENTRATION

Um die Grenzen festzustellen, in denen die stimulierende Aktivität proportional der zugesetzten Extraktproteinkonzentration ist, wurde in mehreren Versuchsreihen die Proteinkonzentration 0,6 bis 5,5 $\mu\text{g}/60 \mu\text{l}$ Ansatz variiert. Anschließend wurde der Stimulierungsfaktor von RNA-Polymerase aus Weizenkeimen quantitativ bestimmt (siehe Material und Methoden).

Die Auswertung der Versuchsreihen ergab, daß nach einem linearen Anstieg bis 2,8 μg Protein/Ansatz die Aktivität mit steigender Proteinkonzentration wieder linear abnimmt (Fig. 10). Bei ca. 2,8 μg Protein/Ansatz wird ein deutliches Maximum der stimulierenden Aktivität beobachtet (Fig. 10).

Bei allen weiteren Versuchen zur Stimulierung von RNA Polymerase wurde daher mit einer Proteinkonzentration der stimulierenden Aktivität von ca. 2,5 bis 3,5 μg je Ansatz durchgeführt. Davon wurde nur abgewichen, wenn eine besonders hohe Anreicherung der stimulierenden Aktivität erzielt worden war.

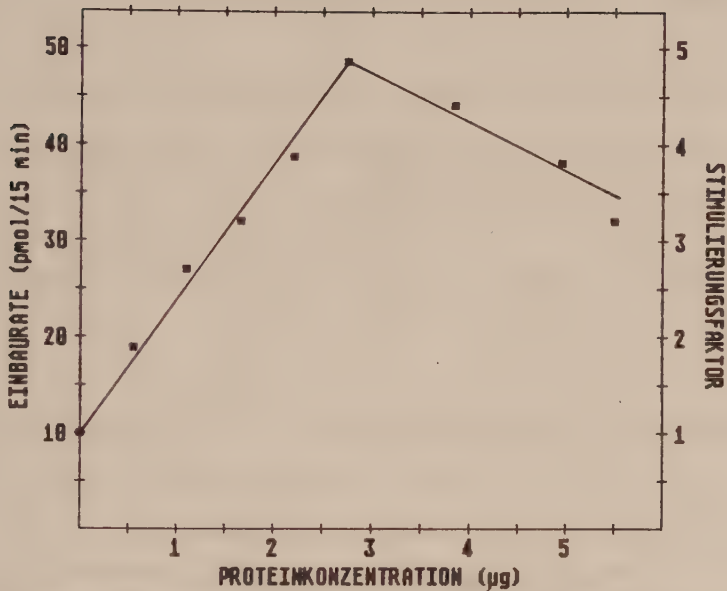


Fig. 10 Abhängigkeit des Stimulierungsfaktors von der Proteinkonzentration

In mehreren Versuchsreihen wurde in einem Standardtranskriptionsansatz (8 mM NaCl) mit polyd(A-T)·d(A-T) (0,09 o.d.₂₆₀/ml) als DNA-Matrize 0,6 bis 5,5 µg ammoniumsulfatgefälltes 0,05 M NaCl Eluat der DEAE-Säulenchromatographie zusammen mit 0,6 µg RNA Polymerase aus Weizenkeimen 15 Minuten bei 30 °C inkubiert (siehe Material und Methoden). Als Bezugs-wert diente ein Ansatz mit RNA Polymerase ohne fraktioniertem Extrakt (48486 cpm/15 min). Die synthetisierte Gesamt-RNA wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt und der Stimulierungsfaktor berechnet.

ABHANGIGKEIT VON DER POLYMERASE-KONZENTRATION

Es war auch notwendig zu erfahren, ob die stimulierende Aktivität von der Konzentration an RNA Polymerase abhängt. Zur Klärung dieser Frage wurde in einer Versuchsreihe der Stimulierungsfaktor bei steigender RNA Polymerasekonzentration ($0.7 - 2.0 \mu\text{g Protein/Ansatz}$) und konstant bleibender Konzentration an stimulierender Aktivität ($3.1 \mu\text{g Protein/Ansatz}$) bestimmt.

Die Auswertung des Versuchs ergibt, daß mit $0.7 \mu\text{g}$ und $1.3 \mu\text{g}$ RNA Polymerase aus Weizenkeimen der Stimulierungsfaktor praktisch unverändert bleibt und die Gesamt-RNA-Synthese in An- und Abwesenheit der stimulierenden Aktivität konstant bleibt (Fig. 11). Bei $2 \mu\text{g}$ RNA Polymerase jedoch wird fast keine Stimulierung mehr nachgewiesen, obwohl die Aktivität der RNA Polymerase allein gegenüber dem Wert mit $0.7 \mu\text{g}$ RNA Polymerase nur um 20% ansteigt.

Die verwendete RNA Polymerase-Konzentration ist also bei den verwendeten Versuchsbedingungen nicht geschwindigkeitsbestimmend, so daß bei allen Versuchen zum Nachweis der stimulierenden Aktivität mit einer Weizenkeim RNA Polymerase Konzentration von 0.7 oder $1.3 \mu\text{g Protein/Ansatz}$ gearbeitet wurde.

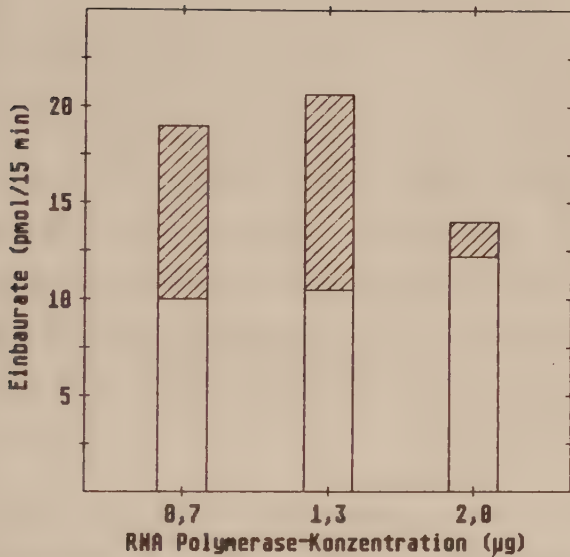


Fig. 11 Abhängigkeit der stimulierenden Aktivität von der RNA Polymerase-konzentration

In einer Versuchsreihe wurde die Konzentration von RNA Polymerase aus Weizenkeimen von 0,7 bis 2,0 µg Protein (bezogen auf den Gesamtproteingehalt) erhöht und in einem 30 µl Standardtranskriptionsansatz (20 mM NaCl) die Stimulierung durch 3,1 µg eines ammoniumsulfatgefällten 0,15 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie (stimulierende Aktivität: 1,5 pmol/15 min-µl quantitativ bestimmt (siehe Material und Methoden). Als DNA-Matrize wurden je 0,33 µg des DNA-Fragments d des Nopalinsynthesegens verwendet. Die Leerbalken geben die RNA Polymeraseaktivität ohne stimulierende Aktivität an (bei 0,7 µg Protein entspricht dies einer Einbaureate an (α - 32 P)UTP von 156744 cpm/15 min) und die überstehenden gestreiften Balken die Aktivität von RNA Polymerase mit stimulierender Aktivität.

ABHÄNGIGKEIT VON DER DNA-KONZENTRATION

Eine Analyse der spezifischen *in vitro* Transkription von HeLa-Ganzzell-extrakten in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration ergab, daß für die Transkription eine Mindestmenge an DNA im Ansatz vorhanden sein muß und große DNA-Konzentrationen zu einer Inhibierung der Transkription führen (Manley et al., 1983). Daher war es wichtig zu untersuchen, ob die stimulierende Aktivität abhängig von der DNA-Konzentration im Standardtranskriptionsansatz ist. Als DNA-Matrize wurde polyd(A-T)·d(A-T) verwendet, da polyd(A-T)·d(A-T) als Standard-DNA bei der Anreicherung der stimulierenden Aktivität eingesetzt wird.

Folglich wurde im Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) in zwei Versuchsreihen die Konzentration an polyd(A-T)·d(A-T) von 0,050 - 0,225 o.d.₂₆₀/ml variiert und die stimulierende Aktivität, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt.

Die Auswertung des Versuchs zeigt, daß die Gesamt-RNA-Synthese in Gegenwart der stimulierenden Aktivität von 0,050 - 0,150 o.d.₂₆₀/ml ansteigt, um von 0,150 - 0,225 o.d.₂₆₀/ml auf ungefähr die Hälfte des maximalen Wertes bei 0,150 o.d.₂₆₀/ml abzufallen (Fig. 12A). Vergleicht man dazu die RNA Polymerase Aktivität allein in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration, so erkennt man, daß die Aktivität von RNA Polymerase mit steigender DNA-Konzentration linear zunimmt (Fig. 12B). Berechnet man nun die stimulierende Aktivität als Differenz von Gesamtaktivität ab-

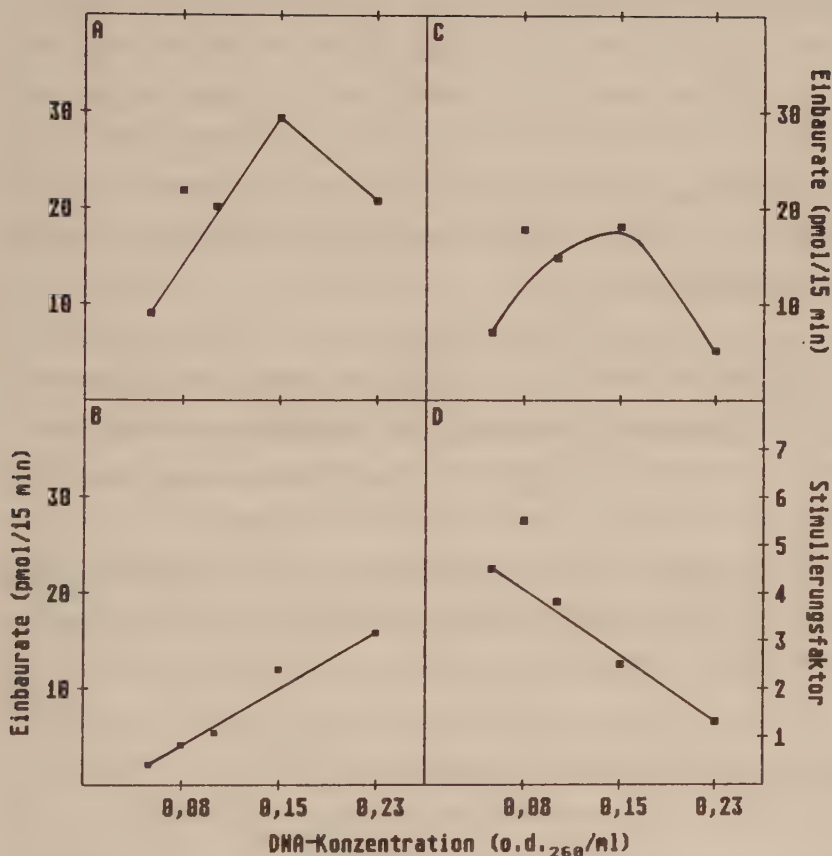


Fig. 12 Abhängigkeit der stimulierenden Aktivität von der DNA-Konzentration

In zwei Versuchsreihen wurden in einem Standardtranskriptionsansatz (25 mM NaCl) 0,050 - 0,225 o.d.₂₆₀/ml polyd(A-T)·d(A-T) in An- oder Abwesenheit von 2,1 µg eines 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie (stimulierende Aktivität: 2,0 pmol/15 min·µl) fünf Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von je 0,6 µg RNA Polymerase aus Weizenkeimen gestartet und nach 15 Minuten wurde die synthetisierte Gesamt-RNA, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt.

- A Abhängigkeit der RNA Polymerase Aktivität mit stimulierender Aktivität von der DNA-Konzentration
- B Abhängigkeit der RNA Polymerase Aktivität ohne stimulierende Aktivität von der DNA-Konzentration
- C Abhängigkeit der stimulierenden Aktivität von der DNA-Konzentration
- D Abhängigkeit des Stimulierungsfaktors von der DNA-Konzentration

züglich der RNA Polymerase Aktivität, so beobachtet man ein breites Maximum zwischen 0,075 - 0,150 o.d.₂₆₀/ml (Fig. 12C). Im Gegensatz dazu nimmt der Stimulierungsfaktor innerhalb einer Streubreite von 10% über den gesamten Meßbereich mit steigender DNA-Konzentration ab (Fig. 12D). Bei 0,225 o.d.₂₆₀/ml polyd(A-T)·d(A-T) beträgt der Stimulierungsfaktor nur noch 1,3, so daß eine Stimulierung von RNA Polymerase nicht mehr sicher nachzuweisen ist.

Der Nachweis der stimulierenden Aktivität im fraktionierten Kernextrakt ist folglich abhängig von der eingesetzten DNA-Konzentration im Standardtranskriptionsansatz und zeigt ein ähnliches Verhalten wie die spezifische *in vitro* Transkription von HeLa-Ganzzellextrakten (Manley et al., 1983). Aus diesem Grund wurde bei der Anreicherung der stimulierenden Aktivität in einem Standardtranskriptionsansatz immer 0,08 bzw. 0,09 o.d.₂₆₀/ml polyd(A-T)·d(A-T) eingesetzt.

ABHÄNGIGKEIT VON DER SALZKONZENTRATION

Manley et al. (1983) berichtet, daß die spezifische *in vitro* Transkription von HeLa-Ganzzellextrakten bei einer Salzkonzentration über 60 mM NaCl oder KCl signifikant inhibiert wird. Es stellte sich daher die Frage, ob die stimulierende Aktivität des Kernextrakts aus Tabakzellen eine ähnlich starke Salzabhängigkeit zeigt.

Um dies festzustellen, wurde in einer Versuchsreihe die Natriumchloridkonzentration von 20 – 90 mM variiert und die stimulierende Aktivität quantitativ bestimmt.

Der Versuch zeigt, daß bei 20 mM NaCl eine 2,6fache Stimulierung von RNA Polymerase aus Weizenkeimen beobachtet wird, welche bei ca. 60 mM NaCl innerhalb der Streubreite bereits völlig verschwunden ist (Fig. 13). Im gleichen Bereich bleibt die Aktivität von RNA Polymerase allein konstant und nimmt erst bei 90 mM NaCl um die Hälfte ab. Hier ist es wichtig anzumerken, daß RNA Polymerase II aus Weizenkeimen ein Salzoptimum bei einer viel höheren Konzentration zeigt (125 mM NH_4^+ , Duda, 1976).

Die stimulierende Aktivität besitzt somit die gleiche starke Salzabhängigkeit wie der HeLa-Ganzzell-extrakt von Manley et al. (1983) und bei allen Versuchen zur Stimulierung von RNA Polymerase wurde daher darauf geachtet, daß die Salzkonzentration im Ansatz nicht größer als 25 mM NaCl beträgt. Aus diesem Grunde wurden auch die ammoniumsulfatgefällten 0,05 M NaCl Eluat der DEAE-Chromatographie gegen 0,05 M NaCl Elutionspuffer (siehe Material und Methoden) über Nacht dialysiert.

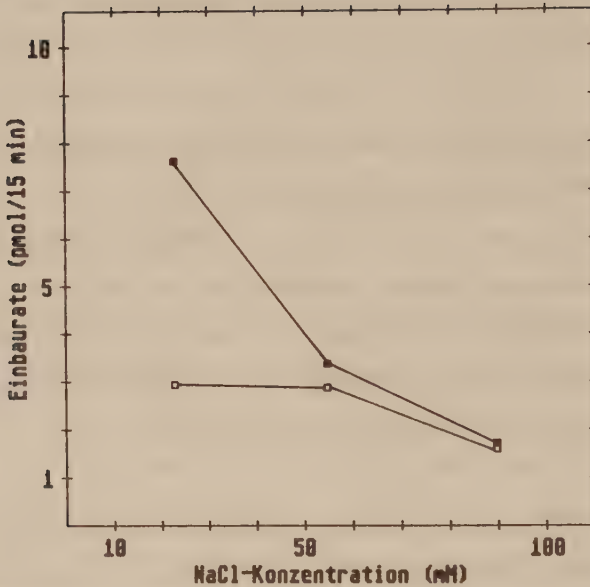


Fig. 13 Abhängigkeit des Stimulierungsfaktors von der Salzkonzentration

In einer Versuchsreihe wurden je 2,5 μg eines ammoniumsulfatgefällten 0,18 M NaCl Eluats der DEAE-Säulenchromatographie (stimulierende Aktivität: 1,8 pmol/15 min· μl) mit 0,33 μg eines 1120 bp langen DNA-Fragments des Nopalinsynthasegens in einem 30 μl Standardtranskriptionsansatz mit 20 – 90 mM NaCl vorinkubiert (siehe Material und Methoden). Durch Zugabe von 0,7 μg RNA Polymerase aus Weizenkeimen wurde die Reaktion gestartet und nach 15 Minuten die synthetisierte Gesamt-RNA quantitativ bestimmt (■) (siehe Material und Methoden). In einem parallelen Ansatz wurde die RNA Polymerase-Aktivität ohne fraktioniertem Kernextrakt bei den jeweiligen Salzkonzentrationen bestimmt (○), welche bei 23 mM NaCl 142167 cpm/15 min betrug.

ANALYSE DER TRANSKRIPTIONSPRODUKTE

Zur Analyse der Transkriptionsprodukte wurde ein 450 bp langes DNA-Fragment des Chalconsynthasegens in einem *in vitro* Standardtranskriptionsansatz mit RNA Polymerase II aus Weizenkeimen inkubiert und die entstandenen Transkripte nach Extraktion mit Phenol in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bei korrekter Initiation (Sommer und Saedler, 1986) und unter Berücksichtigung der flankierenden pUC 18 Vektorsequenzen (Yanisch-Perron et al., 1985) würde ein spezifisches 135 Nukleotide langes Abbruchtranskript erzeugt.

Auf dem Autoradiogramm beobachtet man in Anwesenheit von RNA Polymerase ohne fraktionierten Kernextrakt neben schwachen Banden vier Banden stärkerer Intensität (Fig. 14A, Spur 2, Bande A - D). Interessanterweise werden die Banden A und C durch RNase A-Behandlung nicht vollständig hydrolysiert (Fig. 14B, Spur 6) und auch in Anwesenheit von 1 µg/ml α -Amanitin werden sie als schwache Banden beobachtet (Fig. 14B, Spur 4). Bande B und D entstehen nicht in Anwesenheit von α -Amanitin (Fig. 14B, Spur 4) und sind durch RNase abbaubar (Fig. 14B, Spur 6). Wird nun die *in vitro* Transkription in Anwesenheit von 2,3 µg eines fraktionierten Kernextrakts durchgeführt, so erkennt man auf einem dunklen Hintergrund zwei kleinere neue etwas diffuse Banden (Fig. 14A Spur 5, Bande E und F). Diese neuen Banden sind durch α -Amanitin hemmbar und durch RNase hydrolysierbar (Fig. 14B, Spur 4 und 6). Ferner wird beobachtet, daß die Bande B und D in Anwesenheit des Kernextrakts in ihrer Intensität abgeschwächt wird (Fig. 14A, Spur 6).

Fig. 14 Gelelektrophoretisch Analyse der Transkriptionsprodukte von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen in Abhängigkeit von der stimulierenden Aktivität

In mehreren Standardtranskriptionsansätzen mit je 1.3 mM NaCl (siehe Material und Methoden) wurden in einer Versuchsreihe je 0,12 µg eines 490 bp langen DNA-Fragments des Chalconsynthasegens mit 2,3 µg oder ohne ammoniumsulfatgefälltes 0,05 M NaCl Eluat der DEAE-Chromatographie (stimulierende Aktivität: 21,9 pmol/15 min·µl) in An- oder Abwesenheit von α -Amanitin (1µg/ml) fünf Minuten bei 30 °C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen gestartet. Nach einer 15minütigen Inkubationszeit wurden je 30 µl der Ansätze mit 30 µl Phenol extrahiert und mit 3 Volumen (v/v) Ethanol über Nacht gefällt (siehe Material und Methoden). Zusätzlich wurden 30 µl des Ansatzes 5 mit 10 µg RNase A eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert, phenolextrahiert und mit Ethanol über Nacht gefällt. Die ethanolgefällten Ansätze wurden anschließend in 10 µl TE-Puffer aufgenommen, zusammen mit 10 µl Gelladepuffer drei Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt und in Eis abgeschreckt (siehe Material und Methoden). Danach wurden die Proben zusammen mit den Längenmarkern auf ein 4%iges Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 19 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Die radioaktiven Produkte wurden durch Autoradiographie und die Längenstandards durch $\frac{1}{2}$ stündiges Anfärben mit Ethidiumbromid (2 µg/ml) und Fluoreszenz sichtbar gemacht. Fig. 14A und B stellen dasselbe Autoradiogramm dar, außer daß bei der Herstellung der photographischen Abbildungen die Filmnegative unterschiedlich belichtet wurden, um alle wichtigen Banden gut sichtbar darzustellen.

- 1 Ansatz ohne RNA Polymerase
- 2 Ansatz mit RNA Polymerase
- 3 Ansatz ohne RNA Polymerase aber mit fraktioniertem Kernextrakt
- 4 Ansatz mit RNA Polymerase, mit fraktioniertem Kernextrakt und mit α -Amanitin
- 5 Ansatz mit RNA Polymerase und mit fraktioniertem Kernextrakt
- 6 Ansatz mit RNA Polymerase und mit fraktioniertem Kernextrakt nach Hydrolyse mit RNase A
- 7 pUC18/Dde 1 DNA-Restriktionsfragmente (kb)
- 8 RNA Längenstandard (kb; Fa. Boehringer Mannheim)

A

	1	2	3	4	5	6	7	8
A -								
B -								
C -								
D -								
E -								
F -								

B

	1	2	3	4	5	6	7	8
A -								
B -								
C -								
D -								
E -								
F -								

In einer anderen Versuchsreihe konnte nachträglich festgestellt werden, daß die durch RNase nicht abbaubaren Banden durch Inkubation mit DNase und RNase vollständig hydrolysiert werden (ohne Beleg). Dieses Ergebnis kann man dadurch erklären, daß RNA Polymerase II aus Weizenkeimen analog der RNA Polymerase II aus HeLa Zellen eine RNase-resistente Endmarkierungsaktivität von DNA-Fragmenten mit (α - ^{32}P)NTPs besitzt (Manley et al., 1983)

Die Längenbestimmung mittels pUC18 /Dde I DNA-Restriktionsfragmenten (Spur 7) und dem RNA Längenstandard III der Fa. Boehringer Mannheim (Spur 8) ergibt für die vier Transkripte B, D, E und F folgende Längen:

Transkript B: 470 - 500 Nukleotide

Transkript D: 410 - 450 Nukleotide

Transkript E: 210 - 220 Nukleotide bzw. 310 - 320 Nukleotide (nach RNA Längenstandard)

Transkript F: 150 - 160 Nukleotide bzw. kleiner als 300 Nukleotide (nach RNA Längenstandard)

Das zu erwartende 135 Nukleotide lange Abbruchtranskript (siehe oben) konnte folglich nicht beobachtet werden.

ABHÄNGIGKEIT VON DER VORINKUBATIONSZEIT

Es war interessant zu untersuchen, ob der Kernextrakt in einem Präinitiationsschritt mit der DNA-Matrize vor Zugabe von RNA Polymerase in Wechselwirkung tritt. Um dies zu klären, wurde der Einfluß der Vorinkubation von fraktioniertem Extrakt mit einem 1120 bp langen DNA-Fragment auf den Stimulierungsfaktor von RNA-Polymerase geprüft.

In einer Versuchreihe wurden daher jeweils 3,6 µg eines fraktionierten Kernextrakts 0 – 20 Minuten mit einem 1120 bp langen DNA-Fragment des Nopalinsynthasegens in einem Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) vorinkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe von RNA Polymerase gestartet.

Die Auswertung des Versuchs ergibt, daß eine Vorinkubation von 0 – 20 Minuten des Kernextrakts mit einem DNA-Fragment keinen Einfluß auf den Stimulierungsfaktor hat mit der Annahme, daß die Werte gleichmäßig um den Wert $19,6 \pm 7\%$ schwanken (Fig. 15). Zur Einstellung des Temperaturgleichgewichts wurde der Transkriptionsansatz zusammen mit Kernextrakt bei allen weiteren Versuchen fünf Minuten bei 30 °C vorinkubiert.

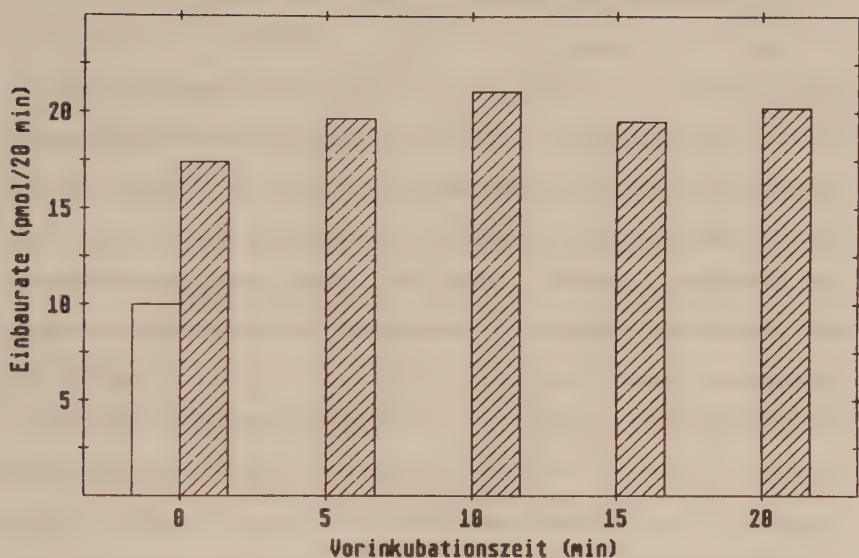


Fig. 15 Abhängigkeit des Stimulierungsfaktors von der Vorinkubationszeit

In einer Versuchsreihe wurden je 3,5 μg eines ammoniumsulfatgefällten 0,1 M NaCl Eluats der DEAE-Säulenchromatographie (stimulierende Aktivität: 1,4 pmol/15 min) mit 0,33 μg eines 1120 bp langen DNA-Fragments des Nopalinsynthasegens (Fragment d) 0 – 20 Minuten bei 30 °C in einem 30 μl Standardtranskriptionsansatz (23 mM NaCl) (siehe Material und Methoden) vorinkubiert (gestreifte Balken). Durch Zugabe von 1,2 μg RNA-Polymerase aus Weizenkeimen wurde die Reaktion gestartet und nach 20 Minuten die Gesamt-RNA quantitativ bestimmt (siehe Material und Methoden). In einem parallelen Ansatz wurde die RNA-Polymerase-Aktivität ohne fraktioniertem Kernextrakt quantitativ bestimmt, welche 243726 cpm/20 min betrug (Leerbalken).

SIMULATION DER STIMULIERENDEN AKTIVITÄT DURCH DNASE

Dynan und Burgess (1979) berichten, daß die Transkription von DNA des Phagen λ mit RNA Polymerase II aus Weizenkeimen durch das kontrollierte Einführen von Einzelstrangbrüchen (*nicks*) durch Hydrolyse mit DNase I aus Pankreas gesteigert wird. Es stellte sich daher die Frage, ob durch Vorinkubation eines DNA-Fragments des Chalconsynthasegens mit DNase I aus Rinderpankreas unter den Reaktionsbedingungen eines Standardtranskriptionsansatzes (siehe Material und Methoden) die Aktivität von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen ebenso gesteigert werden kann. Ferner war es interessant zu untersuchen, wie sich die Produktverteilung einer Transkription eines mit DNase I vorinkubierten DNA-Fragments im Vergleich zu einem nichtvorbehandelten DNA-Fragment ändert.

Daher wurde in einer Versuchsreihe ein 490 bp langes DNA-Fragment des Chalconsynthasegens mit RNA Polymerase aus Weizenkeimen allein oder zusammen mit steigender Konzentration an DNase I inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden die Ansätze mit Phenol extrahiert und die Reaktionprodukte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Gesamt-RNA-Synthese wurde ein Teil der Ansätze durch aufsteigende Chromatographie auf Whatman 3MM Papier, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt.

Wird RNA Polymerase ohne DNase I inkubiert, so beobachtet man fünf diskrete Banden (Fig. 15 Spur 1, Bande A, B, C, E und F) von denen zwei sehr schwach sind (Bande E und F) und nur auf dem Original des Röntgenfilms zu sehen sind. Inkubiert man mit 0,2 bzw. 0,9 μg DNase I, so werden die Banden A, B und C nicht mehr beobachtet (Spur 3 und 4). Mit 0,2 μg DNase I werden die Banden E und F auf dem dunklen Hintergrund (Spur 3) verstärkt und mit 0,9 μg DNase I vollständig abgebaut (Spur 4). Interessanterweise wird mit 0,2 μg DNase I im Ansatz eine 3,5fache Erhöhung der Gesamt-RNA-Synthese durch RNA Polymerase gemessen, welche mit 0,9 μg DNase I auf einen Faktor von 1,9 zurückgeht.

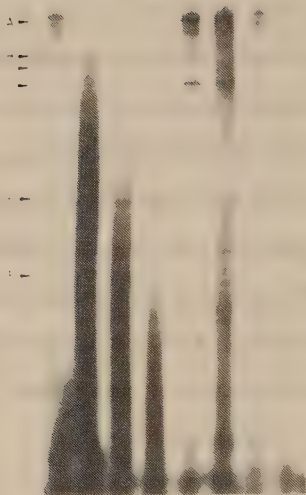


Fig. 16 Gelelektrophoretische Analyse der Transkriptionsprodukte von RNA Polymerase aus Weizenkeimen in Abhängigkeit von DNase I, RNase A, RNase T₁ und fraktioniertem Kernextrakt

In einer Versuchsreihe wurde je 0,12 µg eines 490 bp langen DNA-Fragments des Chalconsynthasogens in einem 60 µl Standardtranskriptionsansatz mit 2,3 µg eines ammoniumsulfatgefällten 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie (stimulierende Aktivität: 21,9 pmol/15 min·µl) mit 0,2 bzw. 0,9 µg DNase I aus Rinderpankreas, mit 0,1 bzw. 1,8 µg DNase freie RNase aus Rinderpankreas oder mit 0,1 bzw. 0,6 µg RNase T₁ aus *Aspergillus oryzae* fünf Minuten vorinkubiert und mit RNA Polymerase aus Weizenkeimen gestartet (siehe Material und Methoden). Parallel dazu wurde in einem Standardtranskriptionsansatz das 490 bp lange DNA-Fragment mit RNA Polymerase allein inkubiert. Nach einer 15minütigen Inkubationszeit wurden die Ansätze mit je 60 µl Phenol extrahiert. Jeweils 20 µl der phenolextrahierten Ansätze wurden zusammen mit 20 µl Gelladepuffer in einem siedenden Wasserbad 2½ Minuten erhitzt, im Eis abgeschreckt und auf einem 4%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 19 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Material und Methoden). Weitere 10 µl der phenolextrahierten Ansätze wurden zur quantitativen Bestimmung der Gesamt-RNA Synthese durch Chromatographie auf Whatman 3MM, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt.

- 1 Ansatz mit RNA Polymerase
- 2 Ansatz mit RNA Polymerase und 2,3 µg fraktioniertem Extrakt
- 3 Ansatz mit RNA Polymerase und 0,2 µg DNase I
- 4 Ansatz mit RNA Polymerase und 0,9 µg DNase I
- 5 Ansatz mit RNA Polymerase und 0,1 µg RNase A
- 6 Ansatz mit RNA Polymerase und 1,8 µg RNase A
- 7 Ansatz mit RNA Polymerase und 0,1 µg RNase T₁
- 8 Ansatz mit RNA Polymerase und 0,6 µg RNase T₁

Zum Vergleich wurde die RNA Polymerase mit 2,3 µg eines ammoniumsulfat-gefällten 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie inkubiert. Man beobachtet, daß die großen Banden A und C fast vollständig im Gegensatz zu Bande B verschwinden (Spur 2). Weitere Banden lassen sich auf dem dunklen Hintergrund nicht erkennen. Die Stimulierung der Gesamt-RNA-Synthese durch fraktionierten Kernextrakt beträgt 3,5fach.

Das Ergebnis stimmt folglich mit der Beobachtung von Dynan und Burgess (1979) überein, daß geringe Mengen an DNase I im Inkubationsansatz die Einbaurrate von radioaktiv markiertem UTP in höhermolekulare Produkte durch RNA Polymerase erhöhen. Die stimulierende Aktivität kann somit durch geringe Mengen an DNase I simuliert werden.

PRÜFUNG AUF *NICKING*-AKTIVITÄT

Eine entscheidende Frage war nun, ob der fraktionierte Kernextrakt frei von Aktivitäten ist, welche Einzelstrangbrüche auf der DNA-Matrize (*nicks*) verursachen. Untersuchungen von Dynan und Burgess (1979) und Lewis und Burgess (1980) ergaben nämlich, daß die durch Einzelstrangbrüche entstehenden 3'-Hydroxylenden der DNA Primer für die RNA Polymerase darstellen und somit die *de novo* Initiation der RNA-Synthese beschleunigen können. In der vorliegenden Arbeit wurde auch gezeigt, daß durch Vorinkubation eines DNA-Fragments mit DNaseI in einem Standardtranskriptionsansatz die stimulierende Aktivität simuliert wird (siehe oben).

Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein radioaktiv markiertes DNA Restriktionsfragmentgemisch (siehe Legende Fig. 17) ohne und mit fraktionierten Kernextrakt in einem Standardtranskriptionsansatz ohne RNA Polymerase inkubiert und auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert.

Ohne fraktioniertem Kernextrakt beobachtet man auf dem Autoradiogramm eine einzige Bande, da die beiden radioaktiv markierten DNA-Restriktionsfragmente auf dem 5%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel nicht getrennt wurden (Fig. 17 Spur 1). In Anwesenheit von 2.5 µg des fraktionierten Kernextrakts wird wiederum eine Bande mit leicht verringerter Mobilität beobachtet (Fig. 17 Spur 3). Die leichte Retardation im Polyacrylamidgel kann man sich dadurch erklären, daß im fraktionierten Kernextrakt DNA-bindende Proteine vorhanden sind, die durch die Phenolextraktion vielleicht nicht vollständig denaturiert wurden und zu einem geringen Teil noch an die DNA binden. Werden nämlich die beiden DNA-Fragmente mit dem fraktionierten Kernextrakt ohne Phenolextraktion auf das Polyacrylamidgel aufgetragen, so bleibt im Gegensatz zu den DNA-Fragmenten ohne fraktionierten Kernextrakt die gesamte Radioaktivität an der Auftragsstelle liegen (ohne Beleg). Die starke Bindung von Extraktproteinen an die DNA scheint auch die Ursache dafür zu sein, daß die Intensität der DNA-Bande im Vergleich zur DNA-Bande ohne Extrakt verringert ist. Durch teilweise Denaturierung der DNA-bindenden Proteine ohne vollständigen Verlust der DNA-Bindefähigkeit gelangen so bei der Phenolextraktion geringe Mengen an DNA in die Zwischenphase aus denaturiertem Protein. Entscheidend bei diesem Experiment ist jedoch, daß durch Inkubation eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentgemisches nach Elektrophorese auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel die DNA-Bande



Fig. 17 Gelelektrophoretische Analyse des Tests auf nicking-Aktivität

2,1 µg unfractionierter Kernextrakt (Spur 2) bzw. 2,5 µg eines ammoniumsulfatgefällten 0,18 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie (stimulierende Aktivität: 1,7 pmol/15 min-µl) (Spur 3) wurden in einem 30 µl Standardtranskriptionsansatz mit je 12 ng eines mit Klenow-Polymerase radioaktiv markierten 595 bp und 534 bp langen Hae II DNA-Restriktionsfragmentgemisches des Chalconsynthasegens (0,5 MCi/mol bzw. 18 PBq/mol) 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Parallel dazu wurde das DNA-Fragmentgemisch in einem Standardtranskriptionsansatz ohne Kernextrakt 15 Minuten bei 30 °C inkubiert (Spur 1). Anschließend wurden die Ansätze dreimal 15 Sekunden lang mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkoholgemisch (1:1:0,02) extrahiert. Die Produktanalyse erfolgte auf einem 5%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel mit 19 V/cm bis die Bromphenolblaubande 10,5 cm weit gelaufen war (siehe Material und Methoden). Nach dem Trocknen des Gels wurden die radioaktiven DNA-Banden durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm mit Verstärkerfolie bei -75 °C sichtbar gemacht.

- 1 radioaktiv markiertes 595 bp und 534 bp langes Fragmentgemisch
- 2 wie 1, nur zusätzlich mit 2,1 µg unfractioniertem Kernextrakt
- 3 wie 1, nur zusätzlich mit 2,5 µg fraktioniertem Kernextrakt

- 1 nur wenig in der Intensität verringert wurde.
2. kein dunkler Hintergrund durch teilhydrolysierte DNA beobachtet wird und
- 3 keine weiteren kleineren DNA-Banden zu beobachten sind, welche auf *nicking*-Aktivitäten zurückzuführen sind.

Zur Kontrolle wurde in einem parallelen Ansatz das DNA-Restriktionsfragmentgemisch mit 2.1 µg unfraktioniertem Kernextrakt 15 Minuten bei 30 ° C inkubiert. Die gelelektrophoretische Analyse zeigt, daß keine Bande auf dem Autoradiogramm sichtbar ist, so daß die DNA-Fragmente unter den gleichen Bedingungen wie mit fraktioniertem Extrakt durch DNase-Aktivitäten im Kernextrakt vollständig hydrolysiert wurden (Spur 2).

Der fraktionierte Kernextrakt ist somit frei von *nicking*-Aktivität, welche eine Stimulierung von RNA Polymerase verursachen könnte. Dieser Befund stimmt auch mit dem Ergebnis überein, daß eine 0 - 20minutige Vorinkubation von einem DNA-Fragment mit fraktioniertem Kernextrakt keinen Einfluß auf den Stimulierungsfaktor besitzt (siehe Fig. 15). Wären nämlich im fraktionierten Kernextrakt *nicking*-Aktivitäten, so müßte nach Dynan und Burgess (1979) die RNA-Synthese mit einer längeren Vorinkubationszeit einen größeren Stimulierungsfaktor besitzen als die RNA-Synthese mit einer kürzeren Vorinkubationszeit, was nicht der Fall ist.

PRÜFUNG AUF BILDUNG EINES PRÄINITIATIONSKOMPLEXES

Bei der Transkription mit HeLa-Ganzzellextrakten wird eine ca. fünfminutige Anlaufphase der spezifischen Transkription beobachtet (Manley, 1983). Es war daher interessant zu untersuchen, ob sich die Bildung eines Präinitiationskomplexes von stimulierender Aktivität mit einem DNA-Fragment des Chalconsynthasegens durch das Beobachten einer Anlaufphase der Gesamt-RNA-Synthese nachweisen läßt.

Folglich wurde in einer Versuchsreihe in einem Zeitraum von 0 - 15 Minuten die Gesamt-RNA-Synthese von RNA-Polymerase aus Weizenkeimen in An- und Abwesenheit der stimulierenden Aktivität ohne Vorinkubation des Extrakts an einem 1226 bp langen DNA-Fragment des Chalconsynthasegens gemessen. Parallel dazu wurde in derselben Versuchsreihe der fraktionierte Extrakt mit dem DNA-Fragment in einem Standardtranskriptionsansatz 15 Minuten lang bei 30 °C vorinkubiert. Die RNA-Synthese wurde durch Zugabe von RNA-Polymerase gestartet und die synthetisierte Gesamt-RNA, wie in Material und Methoden beschrieben, gemessen.

Das Ergebnis des Versuchs ist, daß bei der Inkubation von RNA Polymerase mit stimulierender Aktivität über den gemessenen Zeitraum eine lineare Synthese von Gesamt-RNA beobachtet wird (Fig. 18). Eine Anlaufphase der RNA-Synthese wird unter den angegebenen Inkubationsbedingungen nicht festgestellt. Auch ohne stimulierender Aktivität zeigt die RNA Polymerase keine Anlaufphase in der Gesamt-RNA-Synthese. Diese Kontrolle war

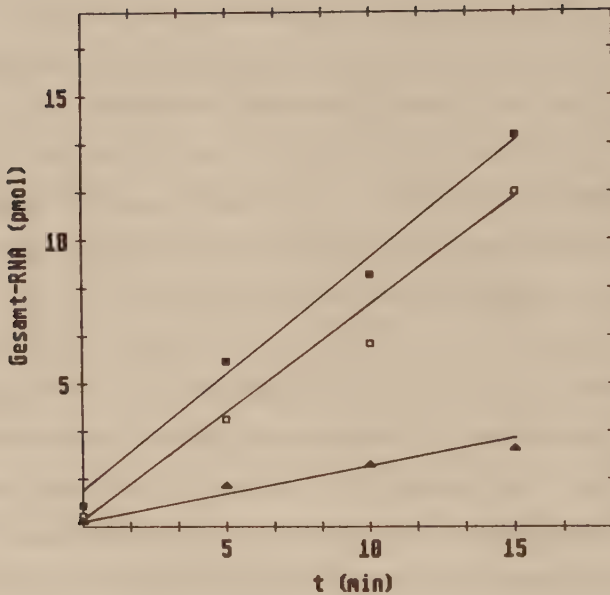


Fig. 18 Zeitabhängigkeit der stimulierenden Aktivität bei 30 °C

In einer Versuchsreihe wurden je 3,5 µg eines 0,18 M NaCl Eluats der DEAE-Säulenchromatographie (stimulierende Aktivität: 1,7 pmol/15 min·µl) nach einer 15minütigen Vorinkubation (■) und ohne Vorinkubation (□) mit je 0,29 µg eines 1222 bp langen DNA-Fragments des Chalconsynthasegens (siehe Fig. 20) in einem Standardtranskriptionsansatz (8 mM NaCl, siehe Material und Methoden) durch Zugabe von 1,9 µg RNA Polymerase aus Weizenkeimen gestartet. In einem Parallelansatz wurde die Gesamt-RNA-Synthese von RNA Polymerase ohne fraktioniertem Extrakt (▲) gemessen. Als DNA Matrize wurden je 0,3 µg eines 1226 bp langen DNA-Fragments des Chalconsynthasegens verwendet. Zusätzlich enthielten die Ansätze je 4 µg 16 S & 32 S rRNA aus *E. coli*, um eine Wirkung von RNasen im fraktionierten Extrakt auf die RNA Polymerase Aktivität zu unterdrücken. Aus den Meßwerten wurde jeweils eine Gerade nach der Methode der kleinsten Quadrate mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99 (mit Vorinkubation) und 0,98 (ohne Vorinkubation) berechnet. Bei der Reaktion von RNA Polymerase ohne stimulierende Aktivität wurde eine Gerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,97 aus allen Meßpunkten berechnet.

wichtig, da die gemessenen Werte der Gesamt-RNA-Synthese von RNA Polymerase allein das Ergebnis der Gesamt-RNA-Synthese von RNA Polymerase mit der stimulierenden Aktivität überlagern können.

Eine 15minutige Vorinkubation der stimulierenden Aktivität mit dem DNA-Fragment hat innerhalb einer Streubreite von $\pm 16 \%$ keinen signifikanten Einfluß auf den Stimulierungsfaktor. Dieses Ergebnis bestätigt erneut den Befund auf Seite 98, daß eine Vorinkubation von fraktioniertem Extrakt mit DNA keinen Einfluß auf den Stimulierungsfaktor hat. Der stimulierende Effekt tritt daher wahrscheinlich erst nach der Präinitiationsphase auf.

Im Gegensatz zur spezifischen Transkription mit HeLa Ganzzelextrakten wird somit bei der Stimulierung von RNA Polymerase mit fraktioniertem Kernextrakt keine Anlaufphase beobachtet, welche auf die Bildung eines Präinitiationskomplexes zurückgeführt werden könnte. Unabhängig davon ergab die Zeitabhängigkeit der Gesamt-RNA-Synthese in An- und Abwesenheit der stimulierenden Aktivität jedoch, daß die Inkubationsbedingungen z. B. bezüglich der Substratsättigung ausreichend sind, um innerhalb einer 15minutigen RNA-Synthese eine lineare Syntheserate zu beobachten. Daher wurden alle Experimente bei einer Inkubationsdauer von 15 Minuten durchgeführt.

STIMULIERUNG DER DINUKLEOTIDSYNTHESE

Eine wichtige Frage bei der Charakterisierung der stimulierenden Aktivität ist, welcher Reaktionsschritt der Transkriptionsreaktion, Initiation oder Elongation, stimuliert wird. Glücklicherweise gibt es in der Dinukleotidsynthese die Möglichkeit, den Start der Transkription als "abortive initiation" (Mosig et al., 1985) getrennt von der Elongation zu untersuchen. Daher wurde unter steady-state Bedingungen (Bösl, 1986) die Stimulierung der Dinukleotidsynthese von RNA Polymerase aus Weizenkeimen durch fraktionierten Kernextrakt studiert.

In einer Versuchsreihe wurde in einem abortiven Initiationsansatz RNA Polymerase aus Weizenkeimen in An- und Abwesenheit der stimulierenden Aktivität $2\frac{1}{2}$ Stunden bei 30 °C inkubiert und die synthetisierte Menge pppApU bzw. pppUpA durch Chromatographie quantitativ bestimmt. Die Auswertung des Versuchs ergibt, daß die Dinukleotidsynthese ungefähr dreifach stimuliert wird (Tab. 10).

Da in einer abortiven Initiationsreaktion nur die Initiation der RNA-Synthese gemessen wird, handelt es sich bei der stimulierenden Aktivität um einen oder mehrere Faktoren, welche die Initiationsreaktion von RNA Polymerase stimulieren.

pppApU-Synthese von RNA Polymerase (p _{hol} /2 ½ h) in Anwesenheit von		Stimulierungs- faktor
—	22	—
stimulierender Aktivität	60	2,7

Tab. 10 Einfluß der stimulierenden Aktivität auf die Dinukleotidsynthese

In einer Versuchsreihe wurde in einem 30 µl abortiven Initiationsansatz unter steady state Bedingungen (Bösl, 1986) mit 0,27 µg eines 1120 bp langen DNA-Fragments des Nopalinsynthasegens 1,2 µg RNA Polymerase aus Weizenkeimen in Abwesenheit und in Anwesenheit von 4 µg ammonium-sulfatgefälltem 0,05 M NaCl Eluat der DEAE-Chromatographie (stimulierende Aktivität: 11,8 pmol/15 min·µl) 2½ Stunden bei 30 °C inkubiert. Die synthetisierte Menge pppApU bzw. pppUpA wurde durch aufsteigende Chromatographie auf Whatman 3MM Papier quantitativ bestimmt (Bösl, 1986). Die Einbaurate von (α-³²P)UTP in pppApU bzw. pppUpA durch RNA Polymerase allein betrug 4647 cpm/2½ Stunden.

EINFLUSS VON rRNA

Fox et al. (1965) zeigten *in vitro*, daß in der DNA-abhängigen RNA-Synthese durch *Micrococcus lysodeikticus* und *Escherichia coli* RNA Polymerasen exogene RNAs effektive Inhibitoren sind und *in vivo* eine mögliche Rolle bei der Kontrolle der RNA-Synthese spielen. In diesem Zusammenhang wurde von Fox et al. (1965) auch der Einfluß von Ribosomen auf die RNA-Synthese diskutiert. Es war nun interessant zu untersuchen, welchen Einfluß ein Zusatz von rRNA auf die RNA-Synthese durch Weizenkeim RNA Polymerase besitzt und welche Wirkung die stimulierende Aktivität auf die RNA Polymerase Aktivität in Anwesenheit von rRNA ausübt.

Daher wurde in einer Versuchsreihe 3,1 µg eines fraktionierten Kernextrakts zusammen mit 0 – 6 µg 16S & 23S rRNA fünf Minuten bei 30 °C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von RNA Polymerase aus Weizenkeimen gestartet. Nach 15 Minuten wurde die Gesamt-RNA-Synthese wie in Material und Methoden beschrieben quantitativ bestimmt.

Die Auswertung des Versuchs ergibt, daß die Gesamt-RNA-Synthese in Abwesenheit der stimulierenden Aktivität durch steigende Mengen an rRNA von 0 - 4 µg bis zu 60% inhibiert wird und von 4 - 6 µg um weitere 10% auf 70% der Gesamt-RNA-Synthese ohne rRNA zurückgeht (Fig. 19B). In Anwesenheit von stimulierender Aktivität wird die Gesamt-RNA-Synthese durch steigende Mengen an rRNA linear bis zu 50% der ursprünglichen RNA Polymerase Aktivität gehemmt (Fig. 19A). Da die RNA Polymerase Aktivität durch 2 bzw. 4 µg rRNA in Abwesenheit der stimulierenden Aktivität stärker gehemmt wird als in Anwesenheit, steigt folglich der Stimulierungsfaktor von 2,5 auf 3,7 (Fig. 19D). Ohne Zusatz an rRNA ist der Stimulierungsfaktor 2,0. Bei 6 µg rRNA wird keine weitere Steigerung des Stimulierungsfaktors beobachtet, da im Vergleich zum Ansatz mit 4 µg rRNA die RNA Polymerase Aktivität ohne stimulierender Aktivität weniger stark inhibiert wird als mit stimulierender Aktivität (Fig. 19A und B). Interessanterweise wird die stimulierende Aktivität (Gesamtaktivität abzüglich RNA Polymerase Aktivität) durch 0 - 4 µg rRNA nicht beeinflußt (Fig. 19C). Erst mit 6 µg rRNA wird ein Rückgang um 30% beobachtet. Ein Zusatz von 2 - 4 µg rRNA wirkt somit nur auf die RNA Polymerase Aktivität hemmend und nicht auf die stimulierende Aktivität.

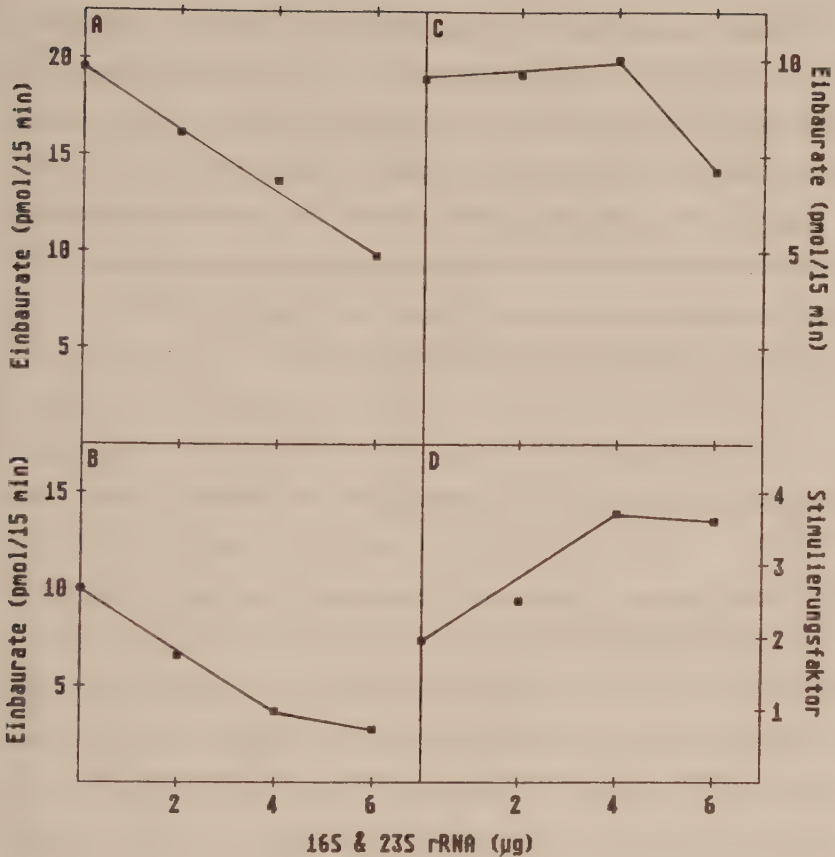


Fig. 19 Einfluß von 16S & 23S rRNA auf die RNA Polymerase Aktivität und auf die stimulierende Aktivität

In einer Versuchsreihe wurde in mehreren 30 µl Standardtranskriptionsansätzen (20 mM NaCl) je 3,1 µg eines ammoniumsulfatgefällten 0,15 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie (stimulierende Aktivität: 1,6 pmol/15 min·µl) zusammen mit 0,33 µg des DNA-Fragments d des Nopalinsynthasegens und steigenden Mengen an 16S & 23S rRNA aus *E. coli* (0 – 6 µg) fünf Minuten bei 30 °C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1,3 µg RNA Polymerase aus Weizenkeimen gestartet. Nach 15minütiger Inkubationszeit wurde die Gesamt-RNA-Synthese, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt. Parallel dazu wurde die RNA Polymerase-Aktivität ohne fraktioniertem Kernextrakt mit steigenden Konzentrationen an rRNA bestimmt. Die Einbastrate von (α - 32 P)UTP durch RNA Polymerase ohne fraktioniertem Kernextrakt und ohne rRNA betrug 164922 cpm/15 min.

- A Abhängigkeit der RNA Polymerase Aktivität mit stimulierender Aktivität von der 16S und 23S rRNA-Konzentration
- B Abhängigkeit der RNA Polymerase Aktivität ohne stimulierender Aktivität von der 16S und 23S rRNA-Konzentration
- C Abhängigkeit der stimulierenden Aktivität von der 16S und 23S rRNA-Konzentration
- D Abhängigkeit des Stimulierungsfaktors von der 16S und 23S rRNA-Konzentration

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen mit *Micrococcus lysodeikticus* und *Escherichia coli* RNA Polymerase (Fox et al., 1965) wird ebenso RNA Polymerase aus Weizenkeimen durch steigende Mengen an rRNA inhibiert. Unabhängig davon beobachtet man, daß die stimulierende Aktivität durch 2 und 4 µg rRNA nicht inhibiert wird, so daß bedingt durch einen Rückgang der RNA Polymerase Aktivität ein steigender Stimulierungsfaktor gemessen wird. Die stimulierende Aktivität ist somit im Gegensatz zur RNA Polymerase unabhängig vom Zusatz kleiner Mengen an rRNA.

SIMULATION DER STIMULIERENDEN AKTIVITÄT DURCH RNASE

Blair (1988) berichtet, daß Nukleasen gelegentlich mit eukaryotischen RNA Polymerasen assoziiert vorkommen oder sogar Komponenten von RNA Polymerasen sind. Beispielsweise wurde eine Ribonuklease H gefunden, welche mit Hefe RNA Polymerase I assoziiert ist (Huet et al., 1977). Unabhängig davon beschreibt die vorliegende Arbeit ein Experiment, bei dem steigende Mengen an RNA die Aktivität von RNA Polymerase aus Weizenkeimen inhibiert (siehe Seite 111). Es stellte sich daher die Frage, welche Wirkung exogene RNase auf die RNA-Synthese bezüglich der Aktivität von RNA Polymerase und bezüglich der Produktverteilung ausübt.

Wie auf Seite 100 mit DNase I bereits beschrieben, wurde ein 490 bp langes DNA-Fragment des Chalconsynthasegens mit RNA Polymerase aus Weizenkeimen allein oder zusammen mit steigender Konzentration an RNase A aus Rinderpankreas (DNase frei; Endoribonuklease, die hinter

Pyrimidinresten spaltet) oder RNase T₁ aus *Aspergillus oryzae* (Endoribonuklease, die neben Guanosinresten spaltet) 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach Extraktion mit Phenol wurden die Reaktionsprodukte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Zusätzlich wurde von einem Teil der Ansätze die Gesamt-RNA-Synthese durch Chromatographie, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt.

In Anwesenheit von 0.1 bzw. 1.8 µg RNase A wird die Bande A der Transkription durch RNA Polymerase verstärkt und Bande B und C verschwindet vollständig (Fig. 16 Spur 5 und 6). Mit 1.8 µg RNase sind Bande E und F neben weiteren Banden sehr schwach zu erkennen. Zusätzlich tritt in Anwesenheit von RNase A eine neue diskrete Bande auf, welche bei einer höheren RNase-Konzentration (1.8 µg/Ansatz) nur wenig abgeschwächt wird (Spur 5 und 6, Bande D). Mit 1.8 µg RNase beobachtet man im Gegensatz zu 0.1 µg RNase einen etwas stärkeren dunklen Hintergrund. Erstaunlicherweise wird die Gesamt-RNA-Synthese durch RNA Polymerase in Anwesenheit von 1.8 µg RNase A um das 3.2fache erhöht und mit 0.1 µg RNase A immer noch um das 1.8fache.

Im Gegensatz zu RNase A beobachtet man mit 0.1 µg bzw. 0.6 µg RNase T₁ keine neue Bande im Vergleich zur RNA Polymerase-Reaktion allein (Spur 7 und 8). Mit 0.1 µg RNase T₁ werden alle RNA Polymerase-Banden abgeschwächt, wobei Bande A und C fast unverändert zu sehen sind. Bande B leicht abgeschwächt wurde und die Banden E und F nicht mehr zu beobachten sind (Spur 1). Mit mehr RNase T₁ (0.6 µg) wird nur noch Bande A auf dem Original des Röntgenfilms schwach beobachtet (Spur 8). Im Gegensatz

zu RNase A wird die gemessene Gesamt-RNA-Synthese durch 0.1 μ g RNase T₁ nicht erhöht und durch 0,6 μ g RNase T₁ sogar um 60% verringert.

Folglich wird durch RNase A im Gegensatz zu RNase T₁ die Aktivität von RNA Polymerase aus Weizenkeimen erhöht und das Auftreten einer neuen diskreten Bande beobachtet. Geringe Mengen an RNase A besitzen somit auch stimulierende Aktivität.

SAURESTABILITÄT

Jervis (1974b) beschreibt pflanzliche RNasen aus *N. tabacum*, welche extrem stabil gegenüber äußeren Einflüssen sind. So überstehen diese RNasen u. a. eine Behandlung mit 0,2 M Essigsäure (pH 3). Sollte die stimulierende Aktivität auf die Wirkung pflanzlicher RNasen zurückzuführen sein, so sollte man erwarten, daß die stimulierende Aktivität verhältnismäßig säurestabil ist.

Um diese Frage zu klären wurden 6 μ g (2 μ l) des fraktionierten Extrakts in einem 10 μ l Inkubationsansatz mit Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 1% versetzt (pH 0,9). Nach einer halbstündigen Inkubation in Eis wurde der gesamte zentrifugierte Reaktionsansatz über Nacht gegen 0,05 M NaCl Elutionspuffer (siehe Material und Methoden) dialysiert und auf stimulierende Aktivität getestet.

Der Versuch zeigt, daß das Dialysat immer noch stimulierende Aktivität besitzt (Tab. 11). Im Gegensatz zum unbehandelten Extrakt verlor der säurebehandelte Extrakt jedoch über die Hälfte seiner Aktivität. Die stimulierende Aktivität besteht somit aus zwei Anteilen, einem säureresistenten Teil und einem säureempfindlichen Teil. Der säureresistente Teil der stimulierenden Aktivität ist vermutlich keine RNase, da die von Jervis beschriebenen RNase aus *N. tabacum* zusätzlich hitzestabil sind (Jervis, 1974a). Die von mir beschriebene stimulierende Aktivität ist jedoch vollständig hitzesensitiv (siehe Seite 77).

Aktivität von RNA Polymerase (pmol/15 min) in Anwesenheit von		Stimulierungs- faktor
—	10,0	—
fraktioniertem Extrakt	36,0	3,6
säurebehandeltem Extrakt	20,4	2,0

Tab. 11 Säurestabilität der stimulierenden Aktivität

6 µg (2 µl) eines ammoniumsulfatgefällten 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie (stimulierende Aktivität: 11,8 pmol/15 min·µl) wurde mit 6 µl 0,05 M NaCl DEAE-Elutionspuffer (siehe Material und Methoden) verdünnt und mit 2 µl 5%iger Trichloressigsäure versetzt. Der mit einem pH-Meter gemessene pH-Wert betrug 0,9. Nach einer halbstündigen Inkubationszeit in Eis wurde der Ansatz bei 11000 g 10 Minuten zentrifugiert und die überstehende Lösung abgenommen. Nach Dialyse in einer Schütt-Dialysenkammer gegen 100 µl 0,05 M NaCl Elutionspuffer über Nacht wurde das gesamte Dialysat in einem Standardinkubationsansatz (8 mM NaCl) mit 0,08 o.d.₂₆₀/ml poly d(A-T)·d(A-T) als DNA-Matrize auf stimulierende Aktivität geprüft (siehe Material und Methoden). Parallel dazu wurde der Stimulierungsfaktor von 6 µg eines unbehandelten fraktionierten Extrakts bestimmt. Im Unterschied zu der in Material und Methoden beschriebenen Herstellung von Kernextrakt wurde der gleiche fraktionierte Kernextrakt verwendet wie auf Seite 82 beschrieben. Die Gesamteinbaurate von (α-³²P)UTP durch RNA Polymerase allein betrug 62028 cpm/15 min.

SELEKTIVE STIMULIERUNG AN CHALCONSYNTHASE-GENFRAGMENTEN

Es zeigte sich, daß die stimulierende Aktivität an allen bisher eingesetzten DNA-Matrizen zu beobachten war. Sogar an einem 910 bp langem eubakteriellen DNA-Fragment aus dem pUC-18 Vektor beobachtet man eine ca. achtfache Stimulierung von RNA Polymerase aus Weizenkeimen (Tab. 12).

Aktivität von RNA Polymerase (pmol/15 min) in Anwesenheit von		Stimulierungs- faktor
—	10,8	—
stimulierender Aktivität	81,5	8,2

Tab. 12 Stimulierung von RNA Polymerase an einem eubakteriellen Plasmid-DNA-Fragment

In einem 30 µl Standardtranskriptionsansatz (20 mM NaCl, siehe Material und Methoden) wurden 0,23 µg eines 910 bp langen Dde I DNA-Restriktionsfragment aus dem pUC 18 Vektor mit 2,8 µg eines ammoniumsulfatgefällten 0,18 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie (stimulierende Aktivität: 1,6 pmol/15 min·µl) fünf Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1,9 µg Weizenkeim RNA Polymerase gestartet und nach 15 Minuten die synthetisierte RNA, wie in Material und Methoden beschrieben quantitativ, bestimmt. Die Gesamteinbaurrate von (α -³²P)UTP durch RNA Polymerase allein betrug 63648 cpm/15 min. Das 910 bp lange DNA-Fragment wurde durch Hydrolyse des pUC-Vektors mit der Restriktionsendonuklease Dde I gewonnen (siehe Material und Methoden).

Es stellte sich daher die Frage, ob die stimulierende Aktivität selektiv bestimmte Sequenzen des stromaufwärts liegenden DNA-Bereichs des Chalconsynthasegens bevorzugt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde der von Sommer und Saedler (1986) sequenzierte 5'-Bereich des Chalconsynthasegens, welcher noch 126 Basenpaare des ersten kodierenden Bereichs enthält, in verschiedene DNA-Fragmente gespalten (Fig. 20). Die isolierten Fragmente wurden anschließend in mehreren Versuchsreihen als DNA-Matrize zur Bestimmung des Stimulierungsfaktors eingesetzt (Fig. 20).

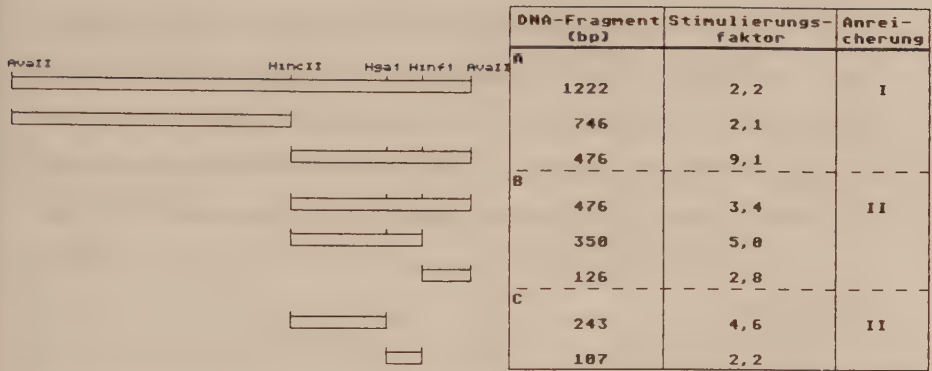


Fig. 20 Vergleich des Stimulierungsfaktors an verschiedenen DNA-Fragmenten des Chalconsynthasegens

In drei Versuchsreihen wurden jeweils in einem Standardtranskriptionsansatz die isolierten DNA-Fragmente mit den ammoniumsulfatgefällten 0,18 M NaCl (Versuchsreihe A) bzw. 0,05 M NaCl (Versuchsreihe B und C) Eluat der DEAE-Chromatographie fünf Minuten bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,7 µg RNA Polymerase aus Weizenkeimen gestartet und nach 15 Minuten die synthetisierte Gesamt-RNA quantitativ bestimmt (siehe Material und Methoden). In jeder Versuchsreihe wurden die DNA-Fragmente in äquimolaren Mengen eingesetzt. Somit enthielten die ersten beiden Versuchsreihen (A und B) je 0,3 pmol DNA/Ansatz. Die dritte Versuchsreihe C enthielt 0,9 pmol DNA/Ansatz, da bei 0,3 pmol DNA eine Stimulierung von RNA Polymerase nicht gemessen werden konnte. Im Unterschied zur ersten Versuchsreihe A (3,6 µg Extraktprotein) enthielten die Ansätze der Versuchsreihen B und C weniger fraktionierten Extrakt (2,3 µg Extraktprotein) da sonst die Ausbeute an stimulierender Aktivität nicht mehr für die restlichen Versuche gereicht hätte. Gleichzeitig wurde auch eine neue Anreicherung mit einer geringeren spezifischen Aktivität verwendet. Die stimulierende Aktivität der Anreicherung I betrug 4,5 pmol/15 min·µl und die der Anreicherung II 2,1 pmol/15 min·µl an polyd(A-T)·d(A-T).

Der Versuch zeigt, daß man unabhängig von der Länge der DNA-Matrize in jeder Versuchsreihe einen besonders hohen Stimulierungsfaktor an einem bestimmten DNA-Fragment beobachtet. Auf diese Weise wurde ein 243 bp langes DNA-Fragment gefunden, an dem eine Stimulierung von RNA Poly-

merase durch fraktionierten Kernextrakt selektiv erfolgt. Dieses DNA-Fragment beinhaltet den stromaufwärtsliegenden Bereich des Chalconsynthasegens von -111 bis -354. Der unterschiedliche Stimulierungsfaktor beim 476 bp langen DNA-Fragment erklärt sich daraus, daß bei den Versuchsreihen B und C sowohl eine andere Anreicherung der stimulierenden Aktivität verwendet, als auch weniger Extrakt eingesetzt wurde, da sonst die Ausbeute an stimulierender Aktivität nicht mehr für die restlichen Versuche gereicht hätte.

Generell kann gesagt werden, daß die Höhe der stimulierenden Aktivität unter gleichen Inkubationsbedingungen abhängig vom eingesetzten DNA-Fragment ist.

WIRKUNG AUF VERSCHIEDENE RNA POLYMERASEN

Es war interessant zu untersuchen, ob die stimulierende Aktivität ausschließlich pflanzliche RNA Polymerase aus Weizenkeimen stimuliert oder ob die Stimulierung unabhängig von der Herkunft der RNA Polymerase ist. Daher wurde in mehreren Standardtranskriptionsansätzen die Aktivität von RNA Polymerase aus Weizenkeimen, *N. tabacum*, Kalbsthymus, *M. vanniellii* und *E. coli* in An- und Abwesenheit eines fraktionierten Kernextrakts bestimmt.

Alle eukaryotischen RNA Polymerasen und sogar die archaeobakterielle RNA Polymerase werden in Anwesenheit der stimulierenden Aktivität ca. zwei- bis elffach stimuliert (Tab. 13), wobei RNA Polymerase aus *M. vanniellii*

am geringsten und RNA Polymerase aus *N. tabacum* am stärksten stimuliert wird. Nur die eubakterielle RNA Polymerase aus *E. coli* wird in Anwesenheit der stimulierenden Aktivität reproduzierbar um 40% inhibiert.

Eine Stimulierung wird somit bei den untersuchten pflanzlichen, tierischen und archaebakteriellen RNA Polymerasen beobachtet und nicht bei *E. coli* RNA Polymerase.

Aktivität von RNA Polymerase (cpm/15 min) aus	ohne stimulierender Aktivität	mit stimulierender Aktivität	Stimulierungs- faktor
Weizenkeimen	94674	586478	5,3
<i>N. tabacum</i>	723	7988	10,9
Kalbsthymus	12834	125562	9,8
<i>M. vanniellii</i>	31230	67338	2,2
<i>E. coli</i>	449490	267378	0,6

Tab. 13 Vergleich des Stimulierungsfaktors an verschiedenen RNA Polymerasen

In einer Versuchsreihe wurde die Stimulierung von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen (1,0 µg Protein), von RNA Polymerase II aus Kalbsthymus (2,8 µg Protein) und von RNA Polymerase aus *E. coli* (Holoenzym; 1,0 µg Protein) durch 2,5 µg eines ammoniumsulfatgefällten 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie (stimulierende Aktivität: 3,3 pmol/15 min·µl) in einem Standardtranskriptionsansatz quantitativ bestimmt (siehe Material und Methoden). Als DNA-Matrize wurde je Ansatz 0,35 µg des DNA-Fragments d vom Nopalinsynthasegen verwendet. In zwei weiteren Versuchsreihen wurde die Stimulierung von RNA Polymerase aus *N. tabacum* (0,5 µg Protein eines 0,3 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie) und von RNA Polymerase aus *M. vanniellii* durch 3,2 µg bzw. 6,0 µg eines ammoniumsulfatgefällten 0,18 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie (stimulierende Aktivität: 3,4 bzw. 11,8 pmol/15 min·µl) in einem Standardtranskriptionsansatz quantitativ bestimmt (siehe Material und Methoden). Als DNA-Matrize wurde bei der RNA Polymerase aus *N. tabacum* 0,38 µg des DNA-Fragments d des Nopalinsynthasegens und bei RNA Polymerase aus *M. vanniellii* 0,005 o.d.₂₆₀ polyd(A-T)·d(A-T) verwendet (Thomm und Wich, 1988). Die Reaktion mit RNA Polymerase aus *M. vanniellii* wurde abweichend von 30 °C Inkubationstemperatur bei 37 °C durchgeführt, da diese RNA Polymerase eine maximale Aktivität bei 40 °C besitzt (Thomm und Wich, 1988).

Untersuchungen zur Protein-DNA-Komplexbildung mit RNA Polymerase II

EINFLUSS ZWEIWERTIGER METALLIONEN AUF DIE BINDUNG VON RNA POLYMERASE II AUS WEIZENKEIMEN AN DNA-FRAGMENTE

DNA-abhängige RNA Polymerase II aus Weizenkeimen ist ein zinkhaltiges Enzym mit sieben Grammatomen Zink pro Mol Enzym und enthält somit mehr festgebundenes Zink als *E. coli* RNA Polymerase (zwei Grammatome Zink/Mol Enzym; Petranyi et al., 1977). Obwohl durch Dialyse gegen 2,5 mM o-Phenanthrolin Tris-Puffer erhaltene zinkfreie RNA Polymerase II aus Weizenkeimen enzymatisch inaktiv ist (Petranyi et al., 1977), vermuten Petranyi et al., daß nicht alle sieben Zinkatome eine Funktion bei der enzymatischen Katalyse besitzen. In diesem Zusammenhang stellte ich mir die Frage, ob RNA Polymerase II aus Weizenkeimen zur Bindung an die DNA als Matrize in der Transkriptionsreaktion noch zusätzlich Zink braucht oder ob die bereits vorhandenen fest gebundenen Zinkatome für die Bindung an die DNA-Matrize ausreichend sind.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Protein-DNA-Komplexbildung von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen an einem 595 bp und 534 bp langen Hae II DNA-Restriktionsfragmentgemisches des Chalconsynthasegens am3/(Avall) (siehe Material und Methoden) in Abhängigkeit verschiedener zweiwertiger Metallionen studiert. In Anlehnung an einen Gelretentionstest von Schneider et al. (1986) wurde je 1,3 µg RNA Polymerase aus Weizenkeimen zusammen mit je 12 ng eines radioaktiv markierten 595 bp und 534 bp langen DNA-Fragmentgemisches (0,02 pmol/Fragment) in An- oder Abwesenheit von 3 mM MgCl₂, MnCl₂ oder ZnCl₂ 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die

Inkubationsansätze enthielten zusätzlich je 0,6 µg polyd(I-C)·d(I-C) als Kompetitor-DNA, da in einem Vorversuch ohne Kompetitor-DNA die gesamte Radioaktivität in der Geltasche des nativen Polyacrylamidgels liegen blieb (ohne Beleg). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, daß ohne Kompetitor-DNA viel RNA Polymerase an die DNA-Fragmente bindet und somit der Protein-DNA-Komplex zu groß wird, um in das native Polyacrylamidgel wandern zu können. Ferner enthielten die Ansätze kein EDTA. Anschließend wurden die Ansätze durch Elektrophorese in einem 4%igen Polyacrylamidgel nach Fried und Crothers (1981) aufgetrennt und die radioaktiven Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

In Abwesenheit von zweiwertigen Metallionen erkennt man drei Banden A, B und C, von denen Bande C nichtretardierte DNA der unter den Elektrophoresebedingungen nicht getrennten 587 bp und 537 bp langen DNA-Fragmente darstellt (Fig. 21 Spur 1 und 2). In Anwesenheit von je 3 mM $MgCl_2$ und $MnCl_2$ ist im Vergleich zum Ansatz ohne Metallionen (Spur 2) Bande A und B leicht verstärkt (Spur 3 und 4). Jedoch in Anwesenheit von 3 mM $ZnCl_2$ verschwindet Bande B völlig und dafür wird Bande A sehr stark verstärkt (Spur 5). Zusätzlich wird Bande C (nichtretardierte DNA) in ihrer Intensität stark vermindert.

Im Gegensatz zu Magnesium und Mangan erhöht somit ausschließlich Zink die Affinität von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen für die DNA-Fragmente, so daß viel weniger freie DNA im Inkubationsansatz nachgewiesen wird. Über die sieben Grammatome festgebundenes Zink hinaus bewirken zusätzliche Zinkatome somit eine Erhöhung der Gleichgewichtsbindungskonstante des RNA Polymerase-DNA-Komplexes.

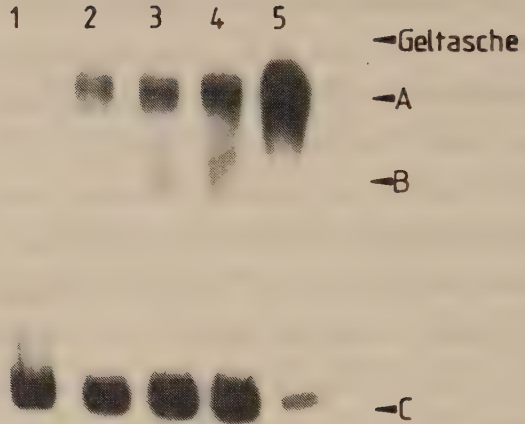


Fig. 21 Gelretentionstest von RNA Polymerase II in Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen

In einer Versuchsreihe wurde in einem 30 μ l Ansatz nach Schneider et al. (1986), jedoch ohne EDTA und mit 0.6 μ g polyd(I-C)-d(I-C), je 1.3 μ g RNA Polymerase II aus Weizenkeimen ohne oder mit je 3 mM $MgCl_2$, $MnCl_2$ oder $ZnCl_2$ fünf Minuten bei 25 °C vorinkubiert. Die Protein-DNA-Bindung wurde durch Zugabe von je 12 ng (0,02 pmol/Fragment) eines radioaktiv markierten 595 bp und 534 bp langen Hae II DNA-Fragmentgemisches des Chalconsynthasegens (170 MCi/mol bzw. 6300 PBq/mol) gestartet. Parallel dazu wurde das DNA-Fragmentgemisch in einem Ansatz ohne Protein 15 Minuten bei 25 °C inkubiert. Nach 10 Minuten bei 25 °C wurde zu jedem Ansatz Probenpuffer gegeben (siehe Material und Methoden) und die Proben auf ein 4%iges Polyacrylamidgel (Acrylamid / N,N'-Methylenbisacrylamid = 82/1, Fried und Crothers, 1981) aufgetragen und bei 10 V/cm elektrophoretisiert. Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in 10%iger Essigsäure fünf Minuten lang geschwenkt (Davies, 1985) und 30 Minuten lang auf einem Vakuumgeltrockner getrocknet. Die radioaktiven Banden wurden durch Autoradiographie über Nacht ohne Verstärkerfolie sichtbar gemacht.

- 1 595 & 534 bp DNA-Fragmente (8224 cpm/ng) ohne Protein
- 2 Ansatz mit 1,3 μ g RNA Polymerase ohne zweiwertige Metalle
- 3 wie Ansatz 2, nur zusätzlich mit 3 mM $MgCl_2$
- 4 wie Ansatz 2, nur zusätzlich mit 3 mM $MnCl_2$
- 5 wie Ansatz 2, nur zusätzlich mit 3 mM $ZnCl_2$

EINFLUSS VON KERNEXTRAKT AUF DIE BINDUNG VON RNA POLYMERASE II AN DNA-FRAGMENTE

Eine mögliche Regulation der Transkription von RNA Polymerase II-transkribierten Genen wird durch das Binden von Kernproteinfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen postuliert (Maier et al., 1987). So beobachtet man die Bildung eines Präinitiationskomplexes aus Kalbsthymus RNA Polymerase II und DNA in Gegenwart mehrerer Transkriptionsfaktoren aus Kalbsthymus, HeLa-Zellen oder Hefe (Buratowski et al., 1989). Ich stellte mir daher die Frage, ob sich anhand hochsensitiver Protein-DNA-Bindungstests die Bildung eines oder mehrerer Protein-DNA-Komplexe aus Weizenkeim RNA Polymerase II und einem fraktionierten Kernextrakt aus Tabakzellen nachweisen läßt.

Zum quantitativen Nachweis von Protein-DNA-Komplexen wurde in zwei getrennten Versuchsreihen einmal ein radioaktiv markiertes 476 bp langes DNA-Fragment und zum anderen ein radioaktiv markiertes 746 bp langes DNA-Fragment des Chalconsynthasegens (vergl. Fig. 20) zusammen mit RNA Polymerase II aus Weizenkeimen oder mit fraktioniertem Kernextrakt oder mit RNA Polymerase und fraktioniertem Kernextrakt in einem Inkubationsansatz nach Schneider et al. (1986) 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Zur Abtrennung von ungebundener DNA wurden die Ansätze durch alkalivorbehandelte Nitrocellulosefilter filtriert (McEntee et al., 1980) und mit 25 mM Hepes-Bindepuffer (siehe Material und Methoden) nachgewaschen. Auf diese Weise werden auf den Filtern nicht freie DNA-Fragmente, sondern nur Protein-DNA-Komplexe zurückgehalten und durch Messen der filtergebundenen Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler quantitativ erfaßt.

Betrachtet man die als Protein-DNA-Komplexe an Nitrocellulose gebundene radioaktive DNA in Prozent der eingesetzten Gesamt-DNA, so erkennt man, daß 33% des 476 bp langen DNA-Fragments, auf dem die DNA-Sequenzen von +122 bis -354 relativ zum Transkriptionsstart liegen, durch RNA Polymerase allein gebunden wird (Tab. 14). Im Gegensatz dazu wird das 746 bp lange DNA-Fragment nur zu 3% durch RNA Polymerase gebunden. Auf dem 746 bp langen DNA-Fragment liegen die Sequenzen von -355 bis -1100 relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Das 476 bp lange DNA-Fragment und das 746 bp lange DNA-Fragment werden durch Proteine des Kernextrakts zu 26% bzw. zu 16% gebunden (Tab. 14). Inkubiert man jedoch die DNA-Fragmente mit fraktioniertem Kernextrakt in Gegenwart von RNA Polymerase, so erkennt man, daß das 746 bp lange DNA-Fragment zu 48% an das Filter gebunden wird. Das ist das 2,5fache und somit weit mehr als die Summe an gebundener DNA vom Ansatz mit RNA Polymerase allein (3%) und vom Ansatz mit fraktioniertem Extrakt allein (16%; Tab. 14). Anders ist es beim 476 bp langen DNA-Fragment, bei dem die durch RNA Polymerase und fraktioniertem Extrakt gebundene DNA (46%) innerhalb einer Schwankungsbreite von $\pm 7\%$ der Summe von gebundener DNA vom Ansatz mit RNA Polymerase allein (33%) und fraktioniertem Extrakt allein (26%) entspricht (Tab. 14). In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu berücksichtigen, daß in beiden Fällen die DNA im Überschuß vorliegt, da nur maximal 48% der eingesetzten DNA durch das Nitrocellulosefilter als Protein-DNA-Komplex gebunden wird.

DNA-Fragment (bp)	Protein	gebundene DNA (x)
476	RNA Polymerase	33
	Kernextrakt	26
	RNA Polymerase + Kernextrakt	46
746	RNA Polymerase	3
	Kernextrakt	16
	RNA Polymerase + Kernextrakt	48

Tab. 14 Bindung von RNA Polymerase und Kernextrakt an DNA-Fragmente

In zwei Versuchsreihen wurden in einem 30 µl Inkubationsansatz nach Schneider et al. (1986, siehe Material und Methoden) je 18 ng (0,06 pmol) eines radioaktiv markierten 476 bp langen DNA-Fragments (2,8 MCi/mol bzw. 103,7 PBq/mol) oder je 150 ng (0,3 pmol) eines radioaktiv markierten 746 bp langen DNA-Fragments (0,3 MCi/mol bzw. 9,2 PBq/mol) mit 0,6 µg RNA Polymerase II aus Weizenkeimen und/oder 1,7 µg eines ammoniumsulfat-gefällten 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Beim 746 bp langen DNA-Fragment wurde wegen einer geringeren spezifischen Radioaktivität fünfmal mehr DNA eingesetzt als beim 476 bp langen DNA-Fragment. Danach wurden die Ansätze durch einen alkalibehandelten Nitrocellulosefilter (McEntee, 1980) filtriert und mit je 5 ml 25 mM Hepes-Bindepuffer (siehe Material und Methoden) nachgewaschen. Die an den Filter gebundene Radioaktivität wurde ohne Zählflüssigkeit im Tritiumkanal eines Flüssigkeitsszintillationszählers gezählt (Cerencóv-Strahlung). Beim 476 bp DNA-Fragment entsprechen 1% gebundene DNA 1743 cpm und beim 746 bp DNA-Fragment 1367 cpm.

Durch dieses Experiment erkennt man, daß RNA Polymerase II aus Weizenkeimen allein besser an DNA-Sequenzen, welche in der Nähe des Transkriptionsstarts liegen, bindet als an entfernter liegende DNA-Sequenzen. Die Bindung von RNA Polymerase an entfernter liegende DNA-Sequenzen kann jedoch durch einen oder mehrere Faktoren des fraktionierten Kernextrakts um das 2 - 3fache gesteigert werden.

Nachdem eine verstärkte DNA-Bindung von RNA Polymerase durch den fraktionierten Kernextrakt quantitativ in einem Nitrocellulose-Bindungstest nachgewiesen worden war, stellte sich die Frage, ob die Bildung eines Protein-DNA-Komplexes auch qualitativ in einem Gelretentionsexperiment beobachtet werden kann.

Hierzu wurde in einer Versuchsreihe ein radioaktiv markiertes 746 bp langes DNA-Fragment zusammen mit RNA Polymerase II aus Weizenkeimen allein oder mit fraktioniertem Kernextrakt oder mit beiden Komponenten 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf einem 1%igen Agarosegel nach Ou-Lee et al. (1988) elektrophoretisch aufgetrennt (Fig. 22).

Auf dem Autoradiogramm beobachtet man, daß in Anwesenheit von RNA Polymerase allein über die Zone freier DNA hinaus (Bande C) keine weitere diskrete Bande entsteht und nur wenig DNA leicht retardiert wird (Fig. 22 Spur 2). In Anwesenheit von fraktioniertem Extrakt wird keine freie DNA-Bande C mehr beobachtet. Stattdessen erscheint die meiste Radioaktivität in der Geltasche und zusätzlich treten noch zwei verschwommene Zonen auf (Spur 3, Bande A und B). Wurden nun zusammen mit dem DNA-Fragment fraktionierter Kernextrakt und RNA Polymerase inkubiert, so erkennt man, wie beim Ansatz mit fraktioniertem Extrakt allein, viel Radioaktivität in der Geltasche und keine freie DNA-Bande C mehr. Darüber hinaus wird die durch den fraktionierten Extrakt leicht retardierte Zone B im Gegensatz zur stärker retardierten Zone A in ihrer Intensität leicht verstärkt und als breite Zone beobachtet (Spur 4).

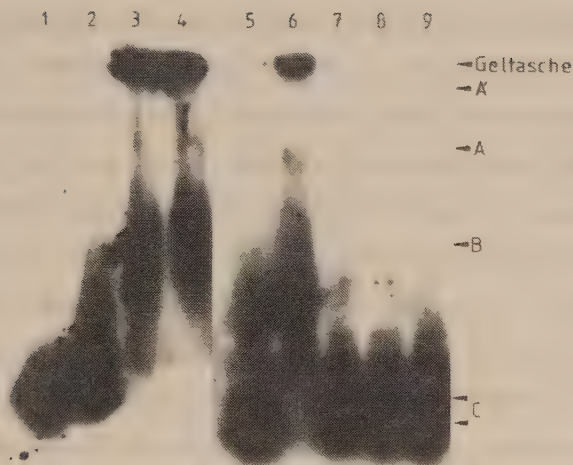


Fig. 22 Gelretentionstest mit RNA Polymerase II und fraktioniertem Kernextrakt

In zwei getrennten Versuchsreihen wurde in einem 30 μ l Ansatz nach Schneider et al. (1986, siehe Material und Methoden) je 42 ng (0,09 pmol) eines radioaktiv markierten 746 bp langen DNA-Fragments des Chalconsynthasegens (2,1 MCi/mol bzw. 78 PBq/mol) mit 0,6 μ g RNA Polymerase II aus Weizenkeimen und/oder 1,7 μ g eines ammoniumsulfatgefällten 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie in An- (Spur 1 - 4) oder in Abwesenheit (Spur 5 - 9) von 1 - 4 μ g polyd(I-C)·d(I-C) 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Parallel dazu wurde das DNA-Fragment in einen Ansatz ohne Protein 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von Gelladepuffer (siehe Material und Methoden) wurden die Ansätze getrennt auf zwei 1%ige Agarosegele mit 4 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt und die radioaktiven Banden durch Autoradiographie bei -75 °C mit Verstärkerfolien sichtbar gemacht.

- 1, 5 746 bp langes DNA-Fragment (radioaktiv markiert)
- 2 wie Ansatz 1, nur zusätzlich mit 0,6 μ g RNA Polymerase
- 3 wie Ansatz 1, nur mit 1,7 μ g fraktioniertem Kernextrakt
- 4, 6 wie Ansatz 1, nur zusätzlich mit 0,6 μ g RNA Polymerase und 1,7 μ g fraktioniertem Kernextrakt
- 7 wie Ansatz 4, nur zusätzlich mit 1 μ g polyd(I-C)·d(I-C)
- 8 wie Ansatz 4, nur zusätzlich mit 2 μ g polyd(I-C)·d(I-C)
- 9 wie Ansatz 4, nur zusätzlich mit 4 μ g polyd(I-C)·d(I-C)

In Anlehnung an den polyd(I-C)·d(I-C)-resistenten Präinitiationskomplex von Adenovirus DNA mit dem allgemeinen Transkriptionsfaktor TF IID (Buratowski et al., 1989) wurde dann geprüft, ob die sich gebildeten Protein-DNA-Komplexe A und B und die Radioaktivität in der Geltasche gegenüber polyd(I-C)·d(I-C) resistent sind. Daher wurde in einem zweiten Gelretentions-experiment zu dem Ansatz mit RNA Polymerase und fraktioniertem Kernextrakt steigende Mengen an polyd(I-C)·d(I-C) (1 - 4 µg) als Kompetitor-DNA zugesetzt. Auf dem Autoradiogramm erkennt man, daß die Radioaktivität in der Geltasche und die leicht retardierte Bande B bereits in Anwesenheit von 1 µg polyd(I-C)·d(I-C) vollständig verschwunden sind (Fig. 22 Spur 7). Ferner erkennt man, daß in Anwesenheit von polyd(I-C)·d(I-C) auf dem Autoradiogramm wieder eine nicht-retardierte DNA-Bande C nachzuweisen ist. Die stark retardierte Bande A wird bei 1 µg polyd(I-C)·d(I-C) in ihrer Intensität auf dem Original des Röntgenfilms sehr geschwächt und mit 4 µg polyd(I-C)·d(I-C) im Ansatz ist auch diese Bande kaum noch zu sehen (Spur 9). Daneben erscheint eine neue, schwache, sehr stark retardierte und gegenüber 1 - 2 µg polyd(I-C)·d(I-C)-resistente Bande A' (Spur 7 - 9).

Dieses Gelretentionsexperiment bestätigt die Ergebnisse des Nitrocellulose-Bindungstests, daß das 746 bp lange DNA-Fragment RNA Polymerase allein im Gegensatz zum fraktionierten Kernextrakt allein nur schlecht bindet. In gleichzeitiger Anwesenheit von RNA Polymerase und fraktioniertem Kernextrakt wird im Unterschied zu der retardierten Bande A und der Radioaktivität in der Geltasche eine bestimmte Bande B in ihrer Intensität leicht verstärkt. Diese verstärkte DNA-Bande B ist jedoch im Gegensatz zu der nicht-verstärkten DNA-Bande A sensitiv gegenüber kleine Mengen an polyd(I-C)·d(I-C) als Kompetitor-DNA.

In den vorangegangenen Experimenten war gefunden worden, daß im fraktionierten Kernextrakt ein oder mehrere Faktoren vorhanden sind, die die Bindung von RNA Polymerase an eine 746 bp langes DNA-Fragment des Chalconsynthasegens verstärken (Tab. 14 und Fig. 22). In einem Kompetitionsexperiment wurde nun geprüft, ob im Kernextrakt Faktoren vorhanden sind, welche in Anwesenheit des 476 bp langen DNA-Fragments als Kompetitor-DNA zusammen mit RNA Polymerase sequenzspezifisch das 746 bp lange DNA-Fragment erkennen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde das radioaktiv markierte 746 bp lange DNA-Fragment des Chalconsynthasegens zusammen mit RNA Polymerase aus Weizenkeimen und fraktioniertem Kernextrakt mit steigenden Mengen an dem nichtradioaktiven 476 bp langen DNA-Fragment als Kompetitor-DNA 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Zum Vergleich wurde auch ein Versuch mit dem nichtmarkierten 746 bp langen DNA-Fragment als Kompetitor-DNA durchgeführt. Anschließend wurden die Ansätze auf einem 1%igen Agarosegel (Ou-Lee et al., 1988) aufgetrennt und die radioaktiven Banden auf einem Autoradiogramm sichtbar gemacht.

Auf dem Autoradiogramm erkennt man, daß in Anwesenheit von RNA Polymerase mit fraktioniertem Kernextrakt und in Abwesenheit von Kompetitor-DNA wie in Fig. 22 sich eine retardierte, breite und diffuse Bande A bildet und Radioaktivität in der Geltasche zu beobachten ist (Fig. 23 Spur 2). Freie DNA-Bande B wird im Gegensatz zum Ansatz ohne Protein nicht nachgewiesen (Spur 1). Infolge einer Verdrängung der radioaktiv-markierten DNA verbreitert sich mit steigender Menge eines 476 bp langen DNA-Fragments als

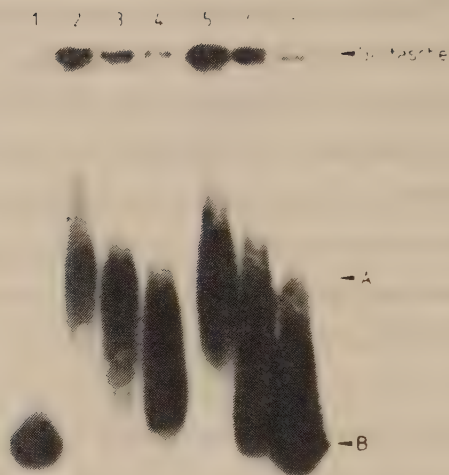


Fig. 23 Gelretention von Protein-DNA-Komplexen mit Kompetitor-DNA

In zwei getrennten Versuchsreihen wurde in einem 30 μ l Ansatz nach Schneider et al. (1986, siehe Material und Methoden) je 42 ng (0,11 pmol) eines radioaktiv markierten 746 bp langen DNA-Fragments des Chalconsynthasegens (2,1 MCi/mol bzw. 78 PBq/mol; siehe Fig. 20) mit 0,6 μ g RNA Polymerase aus Weizenkeimen und 1,7 μ g eines ammoniumsulfatgefällten 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie in An- oder Abwesenheit von 0,15 pmol bzw. 0,49 pmol eines 476 bp langen oder eines 746 bp langen DNA-Fragments des Chalconsynthasegens 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Parallel dazu wurde das DNA-Fragment in einem Ansatz ohne Protein und Kompetitor-DNA 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von Gelladepuffer (siehe Material und Methoden) wurden die Ansätze auf einem 1%igen Agarosegel mit 4 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt und die radioaktiven Banden durch Autoradiographie bei -75 °C mit Verstärkerfolie sichtbar gemacht.

- 1 0,11 pmol eines 746 bp langen DNA-Fragment (2032 cpm/ng)
- 2, 5 wie Ansatz 1, nur zusätzlich mit 0,6 μ g RNA Polymerase und 1,7 μ g Kernextrakt
- 3 wie Ansatz 2, nur zusätzlich mit 0,15 pmol eines 476 bp langen DNA-Fragments (siehe Fig. 20)
- 4 wie Ansatz 2, nur zusätzlich mit 0,49 pmol eines 476 bp langen DNA-Fragments
- 6 wie Ansatz 2, nur zusätzlich mit 0,15 pmol eines 746 bp langen DNA-Fragments
- 7 wie Ansatz 2, nur zusätzlich mit 0,49 pmol eines 746 bp langen DNA-Fragments

Kompetitor-DNA ($1\frac{1}{2}$ facher und $4\frac{1}{2}$ facher molarer Überschuß im Verhältnis zum radioaktiv markierten 746 bp langen DNA-Fragment) die retardierte Bande A zunehmend und wird weniger stark retardiert (Spur 3 und 4). Zusätzlich nimmt die Radioaktivität in der Geltasche stark ab. Kompetiert man dagegen die Assoziatbildung des radioaktiv markierten 746 bp langen DNA-Fragments mit gleichen molaren Mengen des gleichen, aber nichtmarkierten DNA-Fragments, so findet man bereits bei einem $1\frac{1}{2}$ fachen molaren Überschuß eine ungefähr genauso starke Verbreiterung der retardierten DNA-Bande wie bei einem $4\frac{1}{2}$ fachen molaren Überschuß des 476 bp langen DNA-Fragments (Spur 4 und 6). Im Gegensatz zum 476 bp langen DNA-Fragment als Kompetitor-DNA wird bei einem $4\frac{1}{2}$ fachen molaren Überschuß am 746 bp langen nicht-radioaktiven DNA-Fragment freie radioaktive DNA (Bande B) nachgewiesen (Spur 4 und 7). Die Geltaschenbindung des 746 bp langen radioaktiven DNA-Fragments wird aber sowohl durch das unmarkierte 746 bp lange DNA-Fragment als auch durch das unmarkierte 476 bp lange DNA-Fragment in gleichem Umfang reduziert.

Dieses Experiment zeigt, daß bezüglich der in der Geltasche festgestellten Radioaktivität vor allem unspezifisch DNA-bindende Proteine durch die Kompetitor-DNA gebunden werden, da die Radioaktivität in der Geltasche in beiden Fällen vergleichbar stark abnimmt. Bezogen auf die retardierte Bande A ist das 746 bp lange DNA-Fragment jedoch eine ca. dreimal so starke Kompetitor-DNA wie das 481 bp lange DNA-Fragment. Folglich gibt es im fraktionierten Kernextrakt spezifische Proteine, die in Verbindung mit RNA Polymerase an das 746 bp lange DNA-Fragment mit den Sequenzen von -1100 bis -355 relativ zum Transkriptionsstart besser binden als an

das 476 bp lange DNA-Fragment. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den bis jetzt gefundenen Ergebnissen (vergl. Tab. 14 und Fig. 22).

ANALYSE VON PROTEIN-DNA-BINDUNGEN DURCH EXONUKLEASE III

Nachdem im Kernextrakt ein oder mehrere Faktoren nachgewiesen worden waren, die in Verbindung mit RNA Polymerase II ein 746 bp langes DNA-Fragment spezifisch erkennen, war es nun interessant zu untersuchen, welche Sequenzen auf dem Fragment erkannt werden. Ein sensitiver, genauer und schneller Test zum Nachweis von sequenz-spezifischen DNA-Bindeproteinen ist der von Wu (1985) entwickelte sogenannte "exonuclease protection assay". Bei diesem Test hydrolysiert *E. coli* Exonuklease III prozessiv doppelsträngige DNA von beiden 3'-Enden in Richtung der 5'-Enden. Durch proteingeschützte DNA-Bereiche wird die Hydrolyse unterbrochen, so daß die Größe des nicht-vollständig hydrolysierten DNA-Fragments auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel durch Vergleich mit DNA-Längensstandards bestimmt werden kann. Auf diese Weise lassen sich die 3'-Grenzen der DNA-geschützten Bereiche durch Vergleich mit der bekannten DNA-Sequenz ermitteln. Der Vorteil dieses Tests gegenüber dem sogenannten "DNase I footprinting" ist vor allem, daß nicht gebundene DNA durch Exonuklease III vollständig hydrolysiert wird, so daß zum größten Teil nur proteingebundene DNA auf dem Autoradiogramm sichtbar ist. Geringer Hintergrund und der direkte Nachweis geschützter DNA-Bereiche macht es im Gegensatz zur Hydrolyse mit DNase I möglich, auch geringe Mengen an DNA-Bindeproteine zu erkennen (Wu, 1985). Um DNA-Bereiche auszu-

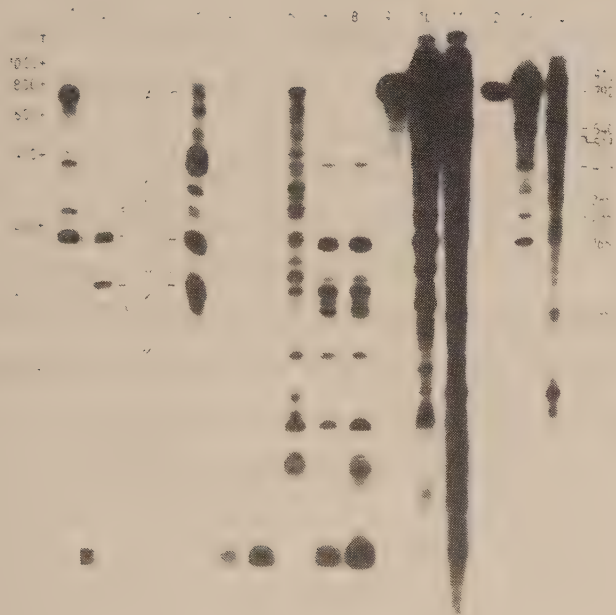
schließen, die durch unspezifisch DNA-bindende Proteine geschützt werden, wurde zusätzlich in Anlehnung an Carthew et al. (1985) und unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem Gelretentionsexperiment mit Kompetitor-DNA (siehe Seite 133) ein nichtmarkiertes DNA-Fragment des Chalconsynthasegens als Kompetitor-DNA eingesetzt. Die Kompetitor-DNA enthält einen anderen Sequenzausschnitt des Chalconsynthasegens als das zu untersuchende 746 bp lange DNA-Fragment (siehe Fig. 20), nämlich den Bereich von +122 bis -354 relativ zum Transkriptionsstartpunkt.

Zum Auffinden proteingeschützter DNA-Bereiche wurde ein am 5'-Ende einseitig radioaktiv markiertes 746 bp langes DNA-Fragment des Chalconsynthasegens zusammen mit RNA Polymerase II aus Weizenkeimen oder mit fraktioniertem Kernextrakt oder mit beiden Komponenten zusammen 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Als Kompetitor-DNA wurde ein unmarkiertes 476 bp langes DNA-Fragment des Chalconsynthasegens verwendet (siehe Fig. 20). Anschließend wurden die ungeschützte DNA durch 400 Einheiten Exonuklease III 30 Minuten bei 30 °C enzymatisch hydrolysiert. Danach wurden alle Ansätze mit Phenol extrahiert und die nicht hydrolysierte DNA mit Ethanol gefällt (siehe Material und Methoden). Die in einem Formamid/Wasser-Gemisch (1:1 v/v) gelösten Niederschläge wurden zur Analyse auf einem 6Xigen Harnstoff-Polyacrylamid Gel aufgetrennt und die Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Fig. 24).

Fig. 24 Hydrolyse des 746 bp langen DNA-Fragments durch Exonuklease III in Abhängigkeit von RNA Polymerase und fraktioniertem Kernextrakt

In zwei getrennten Versuchsreihen wurde in einem 30 µl Ansatz nach Schneider et al. (1986) je 52 ng (0,11 pmol) eines durch Polynukleotidkinase am 5'-Ende der Hind III Restriktionsstelle des pUC 18 Polylinkers radioaktiv markierten 746 bp langen DNA-Fragments des Chalconsynthasegens (0,5 MCi/mol bzw. 17 PBq/mol; Fig. 20) zusammen mit 0,6 µg RNA Polymerase II aus Weizenkeimen und/oder 1,7 µg bzw. 1,5 µg eines ammoniumsulfatgefällten 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie mit oder ohne 96 ng eines 476 bp langen DNA-Fragments des Chalconsynthasegens als Kompetitor-DNA 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Zu je 20 µl der Ansätze der ersten Versuchsreihe (Spur 1 - 2) wurden je 6 mM MgCl₂ und 400 Einheiten Exonuklease III gegeben und in einem Endvolumen von je 33 µl 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Bei der zweiten Versuchsreihe (Spur 3 - 8) wurden zu je 30 µl der Ansätze je 5 mM MgCl₂ und 400 Einheiten Exonuklease III gegeben und in einem Endvolumen von je 33 µl 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen beider Versuchsreihen wurden am Ende der Inkubationszeit durch Zugabe von je 1 µl 0,5M EDTA (pH 7,6) gestoppt. Die Proteine wurden anschließend mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) denaturiert und die nicht hydrolysierte DNA mit Ethanol bei -20 °C gefällt (siehe Material und Methoden). Nach der Zentrifugation bei 11000 g wurde die DNA in je 10 µl Formamid/Wasser (1:1 v/v) durch einminütiges Kochen aufgenommen, mit je 10 µl Probenpuffer (siehe Material und Methoden) versetzt, erneut 1 - 2 Minuten in kochendem Wasser inkubiert und in Eis abgeschreckt. Die Produktanalyse erfolgte auf zwei getrennten 6%igen Harnstoff-Polyacrylamid Gelen bei 13 V/cm. Die einzelnen Banden wurden danach durch Autoradiographie bei -75 °C mit Verstärkerfolie sichtbar gemacht.

- 1 wie 5, nur zusätzlich mit 0,6 µg RNA Polymerase und 96 ng (0,31 pmol) Kompetitor-DNA
- 2 wie 5, nur zusätzlich mit 0,6 µg RNA Polymerase, 1,7 µg fraktioniertem Kernextrakt und 96 ng (0,31 pmol) Kompetitor-DNA
- 3 wie 5, nur zusätzlich mit 0,6 µg RNA Polymerase ohne Kompetitor-DNA
- 4 wie 5, nur zusätzlich mit 1,5 µg fraktioniertem Kernextrakt ohne Kompetitor-DNA
- 5 52 ng [5'-³²P]DNA
- 6 wie 5, nur zusätzlich mit 0,6 µg RNA Polymerase und 1,5 µg fraktioniertem Extrakt ohne Kompetitor-DNA
- 7 wie 6, nur zusätzlich mit 96 ng (0,31 pmol) Kompetitor-DNA
- 8 wie 6, nur zusätzlich mit 168 ng (0,54 pmol) Kompetitor-DNA
- 9+12 746 bp langes DNA-Fragment (979 cpm/ng) zum Vergleich
- 10+13 pUC18/Dde I als DNA-Längenstandard (bp)
- 11+14 pUC18/Hinf I als DNA-Längenstandard (nicht vollständig hydrolysiert; bp)



Betrachtet man die Autoradiogramme der Ansätze ohne Kompetitor-DNA (Spur 3 - 6), so beobachtet man in Anwesenheit von fraktioniertem Kernextrakt und RNA Polymerase (Spur 6) eine Leiter aus vielen schwachen Banden, die proteingeschützten DNA-Bereichen entsprechen. In Anwesenheit von steigenden Mengen an Kompetitor-DNA (Spur 7 und 8) werden durch die Verdrängung unspezifisch gebundener Proteine viel weniger Banden beobachtet als beim Ansatz ohne Kompetitor-DNA (Spur 6, 7 und 8; Bande B - P). Ein Vergleich mit den DNA-Längenstandards (Spur 9 - 14; siehe Legende Tab. 15) ergibt für die Banden B - M einen Bereich von 416 - 59 Nukleotiden Länge und für die Banden N - P einen Bereich von 20 - 4 Nukleotiden Länge. Da an das 5'-Ende des verwendeten radioaktiven Chalcon-synthasegenfragments noch 37 bp des pUC 18 Vektors folgen, fallen die Banden N - P folglich in den DNA-Bereich des Vektors und werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

In Anwesenheit von Kompetitor-DNA (Spur 7 und 8) werden im Vergleich mit dem Ansatz ohne Kompetitor-DNA (Spur 6) die Banden B, D, E (nur noch auf dem Original des Röntgenfilms zu sehen), F und H in ihrer Intensität geschwächt, die Banden G, I, K und L werden verstärkt und die Banden C und M bleiben unverändert. Bande A verschwindet hingegen völlig in Anwesenheit von Kompetitor-DNA (Spur 6 und 7). Eine größere Menge an Kompetitor-DNA (4,9facher molarer Überschuß) verändert die Intensität der Banden B - M im Vergleich zum Ansatz mit weniger Kompetitor-DNA (2,8facher molarer Überschuß) nicht wesentlich (Spur 7 und 8). Weizenkeim RNA Polymerase schützt folglich zusammen mit fraktioniertem Kernextrakt spezifisch bestimmte DNA-Sequenzen des 746 bp langen DNA-Fragments vor Hydrolyse mit Exonuklease III.

Betrachtet man den Ansatz mit RNA Polymerase allein, also ohne fraktionierten Kernextrakt und ohne Kompetitor-DNA (Spur 3), so beobachtet man mehrere DNA-Banden, von denen besonders Bande B, C, G und I vor Hydrolyse mit Exonuklease III geschützt und deshalb als dicke Banden erkennbar sind. Vergleicht man die Kompetitor-DNA resistenten Banden der Ansätze von RNA Polymerase in Gegenwart von fraktioniertem Kernextrakt (Spur 7 und 8) mit dem Ansatz von RNA Polymerase allein (Spur 3), so werden im Gegensatz zu allen anderen Banden die Banden L, M und vermutlich auch Bande H verstärkt. Das ist deshalb ungewöhnlich, weil der fraktionierte Kernextrakt allein die DNA vor Hydrolyse mit Exonuklease III nur unwesentlich schützt (Spur 4). In Anwesenheit von fraktioniertem Kernextrakt erhöht sich also die Bindungsaffinität der RNA Polymerase an bestimmte DNA-Sequenzen des 746 bp langen DNA-Fragments und schützt folglich diese verstärkt vor Hydrolyse mit Exonuklease III. Auffallend bei den Versuchen in Spur 3, 4, 6, 7 und 8 ist, daß die Bande M als einzige Bande unabhängig von der Kompetitor-DNA in Anwesenheit von RNA Polymerase und fraktioniertem Kernextrakt im Vergleich zu den Ansätzen von RNA Polymerase allein bzw. von fraktioniertem Kernextrakt allein verstärkt wird.

Um zu prüfen, ob die Exonukleaseaktivität ausreicht, die DNA vollständig zu hydrolysieren, wurde in einem Kontrollansatz unter den gleichen Inkubationsbedingungen, aber in Abwesenheit von Protein die DNA mit Exonuklease hydrolysiert (Spur 5). Man beobachtet, daß im Bereich der Banden A - M keine einzige DNA-Bande zu beobachten ist. Bande N und O sind nur auf dem Original des Röntgenfilms zu erkennen und die niedermolekulare

Doppelbande P ist deutlich zu erkennen (Spur 5). Die Aktivität des Enzyms ist folglich ausreichend, um den zu untersuchenden DNA-Bereich des Chalconsynthasegens vollständig zu hydrolysieren.

Um zu sehen, ob das Bandenmuster, welches durch Schutz des radioaktiv markierten DNA-Fragments durch RNA Polymerase in Gegenwart von fraktioniertem Kernextrakt und Kompetitor-DNA entstanden ist (Spur 7), reproduziert werden kann, wurde unter ähnlichen Inkubationsbedingungen das Experiment an einem anderen Tag wiederholt. Im Gegensatz zu dem Experiment 7 wurde bei diesem Experiment die Konzentration des fraktionierten Kernextrakts nur unwesentlich von 1.5 $\mu\text{g}/30\ \mu\text{l}$ auf 1.7 $\mu\text{g}/30\ \mu\text{l}$ erhöht. Zusammen mit 6 mM MgCl_2 (Experiment 7 mit 5 mM MgCl_2) wurde die ungeschützte DNA anschließend durch 400 Einheiten Exonuklease III 30 Minuten bei 30 °C hydrolysiert und, wie bereits oben beschrieben, weiter aufgearbeitet.

Ebenso wie beim Ansatz 7 beobachtet man beim Ansatz 2 mehrere diskrete Banden (Spur 2 und 7, Bande B - P), die sowohl in der Intensitätsabstufung, als auch in der Wanderungsstrecke sehr ähnlich sind. Jedoch ist die Intensität der Banden vom Ansatz 2 (Spur 2) insgesamt viel schwächer als die Banden vom Ansatz 7 (Spur 7), da beim Ansatz 2 für die Hydrolyse mit Exonuklease nur $\frac{2}{3}$ des Ansatzvolumens verwendet und auf das Polyacrylamidgel aufgetragen wurde (siehe Legende Fig. 24) und so unabhängig vom Schutz alle Banden der Spur 2 schwächer sind als die Banden der Spur 7. Aus diesem Grund werden auch die Banden B, D, E und H der Spur 7 in der Spur 2 nur auf dem Original des Röntgenfilms als sehr

schwache Bande beobachtet und die breite Bande G in Spur 7 erscheint als deutliche Doppelbande in Spur 2. Das Bandenmuster des Exonuklease III Schutzexperiments an dem 746 bp langen DNA-Fragment (siehe Fig. 20) in Anwesenheit von RNA Polymerase, fraktioniertem Kernextrakt und Kompetitor-DNA ist somit reproduzierbar.

Um in einem Kontrollansatz ferner zu sehen, welchen Einfluß die unmarkierte Kompetitor-DNA auf die Wechselwirkung zwischen RNA Polymerase und dem radioaktiv markierten 746 bp langen DNA-Fragment in Abwesenheit von Kernextrakt hat, wurde das entsprechende Experiment mit Kompetitor-DNA durchgeführt (Spur 1).

Ebenso wie beim Ansatz von RNA Polymerase allein ohne Kompetitor-DNA (Spur 3) werden beim Ansatz mit Kompetitor-DNA (Spur 1) die Banden B - G und I beobachtet. Die Banden H, K, L und M werden jedoch nur auf dem Original des Röntgenfilms als äußerst schwache Banden erkannt. Im allgemeinen ist beim Ansatz mit Kompetitor-DNA (Spur 1) die Intensität der DNA-Banden B - M geringer als beim Ansatz ohne Kompetitor-DNA (Spur 3), da auch hier, wie beim Ansatz von RNA Polymerase und fraktioniertem Kernextrakt (Spur 2), nur $\frac{2}{3}$ des Ansatzes mit Exonuklease hydrolysiert wurde (siehe Legende Fig. 24). Auffallend ist, daß in Anwesenheit von Kompetitor-DNA oberhalb der Bande B eine starke Bande von der Größe des radioaktiv markierten DNA-Fragments als nicht-hydrolysierte DNA erscheint (Spur 1, Bande A), welche ohne Kompetitor-DNA nur als eine schwache und breite Zone zu beobachten ist (Spur 3). Ferner wird durch die Anwesenheit von Kompetitor-DNA (Spur 1) verglichen mit dem Ansatz

ohne Kompetitor-DNA (Spur 3) die Bande B wahrscheinlich abgeschwächt und die Bande F verstärkt, wenn man berücksichtigt, daß alle Banden der Spur 1 im Vergleich zur Spur 3 eine geringere Intensität haben (siehe Legende Fig. 24). Entscheidend ist jedoch, daß in Anwesenheit von Kompetitor-DNA die Banden H, I, K, L und M durch RNA Polymerase in Gegenwart von fraktioniertem Kernextrakt (Spur 2) im Vergleich zu dem Ansatz mit RNA Polymerase allein verstärkt werden. In Abwesenheit von Kompetitor-DNA (Spur 3 und 6) werden von den Banden H, I, K, L und M nur die Banden H und M durch RNA Polymerase und fraktioniertem Kernextrakt deutlich verstärkt.

Vergleicht man die Fragmentlängen der Banden H, L und M, so fällt auf, daß sich die Längen der DNA-Banden H und L bzw. L und M um ca. 35 - 36 bzw. um ca. 29 - 31 Nukleotide unterscheiden (Tab. 15). Dieser Befund ist deshalb interessant, weil RNA Polymerase II aus Weizenkeimen 38 bzw. 34 Basenpaare von SV 40 DNA vor Hydrolyse durch DNase I bzw. *Micrococcus* Nuklease schützt (Chandler und Gralla, 1980). Vergleicht man die Fragmentlängen der DNA-Banden I, K und L, so unterscheiden sich die Längen der DNA-Banden I und K bzw. K und L um 9 - 10 bzw. um 10 Nukleotide (Tab. 15), was einer B-DNA Helixwindung von 10 Basenpaaren pro Windung entspricht (Lewin, 1985).

DNA-BANDE	Längenberechnung (Nukleotide) nach	
	Formel 1	Formel 2
H	89	73
I	73	57
K	63 $\Delta=36$	48 $\Delta=35$
L	53	38
M	22 $\Delta=31$	9 $\Delta=29$

Tab. 15 Längenbestimmung ausgewählter DNA-Banden der Exonuklease III Schutzexperimente

Für die Längenbestimmung der DNA-Banden auf dem Autoradiogramm der Exonuklease III Schutzexperimente wurden radioaktiv markierte pUC18/Dde I bzw. pUC 18/Hinf I Restriktionsfragmente verwendet und parallel zu den Ansätzen auf das 6%ige Harnstoff-Polyacrylamid Gel aufgetragen. Die Berechnung der Eichgeraden wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate durchgeführt, wobei zwischen zwei Längenbereichen unterschieden wurde. Der erste Bereich erstreckt sich von 910 bis 235 Nukleotide. Die dazugehörige Formel lautet $y = 3,113 - 0,013x$ (Formel 1) mit einem Korrelationskoeffizienten von -0,996. Der zweite Bereich erstreckt sich von 286 bis 75 Nukleotide und die Formel lautet $y = 3,211 - 0,015x$ (Formel 2) mit einem Korrelationskoeffizienten von -0,999. Die angegebenen Fragmentlängen sind bereits um die Sequenzen des flankierenden Polylinkers (37 Nukleotide) bereinigt.

Diskussion

Zahlreiche *in vitro* Transkriptionsstudien mit hochgereinigten eukaryotischen RNA Polymerasen führten zu der Erkenntnis, daß diese im Gegensatz zu prokaryotischen RNA Polymerasen keine spezifische Stellen auf der DNA-Matrize erkennen können (Cooke et al., 1984). Obwohl eukaryotische RNA Polymerasen in der Regel aus viel mehr Untereinheiten zusammengesetzt sind als prokaryotische RNA Polymerasen (Roeder, 1976), konnte mit RNA Polymerase II aus Kalbsthymus und mit RNA Polymerase III aus *Xenopus laevis* Oocyten bereits gezeigt werden, daß zur Ausbildung eines Transkriptionskomplexes neben RNA Polymerase und DNA auch verschiedene Hilfsproteine (Transkriptionsfaktoren) notwendig sind (Buratowski et al., 1989; Wingender & Seifart, 1987). In Anlehnung an diese Ergebnisse bestand somit die Aufgabe in einem rein pflanzlichen Transkriptionssystem Transkriptionsfaktoren nachzuweisen und näher zu charakterisieren.

Als Komponenten wurde zum einen RNA Polymerase II aus Weizenkeimen gewählt, da Weizenkeim RNA Polymerase eine ähnliche Struktur der Untereinheiten und eine ähnliche Sensitivität gegenüber α -Amanitin zeigt wie Säuger RNA Polymerase (Dyanan & Burgess, 1979). Zum anderen wurde ein DNA-Fragment des Chalconsynthasegens gewählt, da eine große Homologie der Promotorsequenzen mit bekannten eukaryotischen Promotoren besteht (Sommer & Saedler, 1986). Als Quelle der nachzuweisenden Transkriptions-

faktoren wurden Extrakte aus Zellkernen von *N. tabacum* hergestellt, da eine Methode zur Herstellung hochgereinigter Zellkerne bei Willmitzer und Wagner (1981) ausführlich beschrieben ist.

Die Anreicherung der stimulierenden Aktivität erwies sich als besonders schwierig, da Transkriptionsfaktoren i. a. in sehr geringen Mengen in Zellkernen vorkommen (Briggs et al., 1986) und somit durch eine zu starke Verdünnung während der Anreicherung die stimulierende Aktivität nicht mehr sicher nachzuweisen ist. Ferner war es schwierig die stimulierende Aktivität von Inhibitoren abzutrennen, die in vermehrtem Maße bei weniger sauber angereicherten Zellkernen nachgewiesen wurden (ohne Beleg). Somit ist die Isolierung von sauberen und intakten Kernen der erste notwendige Schritt zur Anreicherung von kernspezifischen Proteinen, wie RNA Polymerase und Transkriptionsfaktoren (Rizzo et al., 1978).

Ein kritischer Schritt bei der Zellkernanreicherung ist das Aufbrechen der Zellwände ohne die Kerne zu zerstören. Es erwies sich dabei vorteilhaft die Konzentration von Cellulase und Pectinase um die Hälfte bzw. um das Doppelte als bei Willmitzer und Wagner (1981) angegeben zu erhöhen und die Inkubationzeit zu verdreifachen, weil die Tabakzellen anschließend mit dem Ultraturrax schonender aufgebrochen werden können (siehe Seite 60). Ferner wurde das Entstehen der aufgebrochenen Zellen mit dem Mikroskop beobachtet und die Homogenisierung mittels Ultra-Turrax vor dem vermehrten Auftreten kleinster Zellfragmente abgebrochen. Auf diese Weise wurden mikroskopisch reine und intakte Zellkerne erhalten, was

nach Szopa und Wagner (1984) einen Anreicherungsgrad von mehr als drei bezogen auf die RNA Polymerase Aktivität bedeutet. Einen Hinweis auf die Unversehrtheit der angereicherten Zellkerne liefert die Tatsache, daß nach mehrmaligem Waschen der Kerne bei niedriger Salzkonzentration (7,5 mM KCl) α -Amanitin sensitive und insensitive RNA Polymerase im Verhältnis 1:2 als kernspezifische Proteine (Willmitzer & Wagner, 1981) durch Hochsalzpuffer (350 mM NaCl) extrahiert wurden (Tab. 2a). Neben RNA Polymerase wurde auch eine RNA Polymerase stimulierende Aktivität und eine DNA-bindende Aktivität aus den Zellkernen extrahiert (Tab. 2b). Die Ausbeute an stimulierender Aktivität konnte sogar noch um das Dreifache durch ein Aufbrechen der Kerne in der Parrbombe bei 350 mM NaCl erhöht werden (Tab. 3).

Folgende Befunde sprechen für mehrere stimulierende Aktivitäten im Kernextrakt:

1. Das 0,05 M NaCl Eluat der DEAE-Chromatographie zeigt bei 280 nm ein breites Absorptionsprofil und besteht aus zwei Aktivitätsmaxima (Fig. 6).
2. Durch Fraktionierung des 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie an Phosphocellulose wurden mehrere Fraktionen erhalten, die RNA Polymerase stimulieren (Tab. 7).
3. Durch Behandlung des ammoniumsulfatgefällten 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie mit 1%iger Trichloressigsäure (pH 0,9) wurde im zentrifugierten und dialysierten Überstand immer noch 40% der stimulierenden Gesamtaktivität nachgewiesen (Tab. 11). Dieser Befund

deutet auf eine säurestabile und eine säurelabile stimulierende Aktivität im Kernextrakt hin.

4. Es konnte gezeigt werden, daß RNA Polymerase aus Weizenkeimen in einem *in vitro* Standardtranskriptionsansatz durch 0,2 µg DNase I aus Rinderpankreas und durch 1,8 µg RNase A aus Rinderpankreas ca. dreifach erhöht wird (siehe Seite 100 und 114). Unfraktionierter Kernextrakt ist reich an DNasen und RNasen (Fig. 2 und 3) welche vermutlich ebenso wie DNase I und RNase A aus Rinderpankreas Weizenkeim RNA Polymerase stimulieren können.
5. Der Anreicherungsgrad wird durch eine Ammoniumsulfatfällung des 0,05 M NaCl Eluats der DEAE-Chromatographie nicht weiter gesteigert (Tab. 5). Eine mögliche Ursache könnte sein, daß weitere, von der charakterisierten stimulierenden Aktivität verschiedene stimulierende Aktivitäten, wie z. B. DNase und RNase, im Kernextrakt vorkommen. Diese bleiben hingegen zum größten Teil im Überstand der Ammoniumsulfatfällung und werden verworfen.

Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß jeder fraktionierte Kernextrakt frei von DNasen und RNasen ist, sprechen folgende Experimente für die Anwesenheit einer von DNase und RNase unabhängigen stimulierenden Aktivität:

1. Unabhängig von der Länge der Vorinkubationszeit von fraktioniertem Kernextrakt mit einem DNA-Fragment wird innerhalb einer Fehlergrenze von $\pm 7\%$ der gleiche Stimulierungsfaktor gemessen (Fig. 15).

2. Durch Vorinkubation eines radioaktiv markierten DNA-Fragments mit fraktioniertem Kernextrakt konnte keine *nicking*-Aktivität nachgewiesen werden (Fig. 17).
3. Die RNA-Syntheserate ist in Anwesenheit von fraktioniertem Kernextrakt innerhalb einer Inkubationszeit von 15 Minuten linear (Fig. 18).
4. Die Höhe der stimulierenden Aktivität ist bei ähnlichem AT-Gehalt der DNA-Matrize abhängig von der DNA-Sequenz (Fig. 20).
5. Die stimulierende Aktivität ist vollständig hitzesensitiv (Fig. 8). RNase 1 bzw. RNase 2 aus Tabakblättern verliert jedoch nach einer 10minütigen Inkubation bei 100 °C nur 5% bzw. 20% ihrer Aktivität (Jervis, 1974a).
6. Bis zu 4 µg exogene rRNA hat auf die stimulierende Aktivität keinen Einfluß (Fig. 19). Daraus kann man schließen, daß die Stimulierung von RNA Polymerase nicht durch RNasen im Kernextrakt verursacht wird, da ein Zusatz an exogener RNA einen Rückgang der Stimulierung verursachen müßte.

Hochgereinigte Säuger RNA Polymerasen können ebenso durch Polyamine, wie Spermin und Spermidin, und Sulfhydrylreagenzien, wie Dithiothreitol oder Mercaptoethanol, stimuliert werden (Blair, 1988). Der Nachweis des Proteincharakters der stimulierenden Aktivität über Hitze- und Proteasesensitivität (Fig. 8 und Tab. 8). schließt diese Reagenzien und andere organische wie anorganische Bestandteile des Kernisolierungspuffers C (siehe Material und Methoden) bzw. der Zellkerne selbst als stimulierende Aktivitäten aus. Sogar von Rinderserumalbumin, ein weiterer Bestandteil des Kernisolierungspuffers C, wird berichtet, daß es eukaryotische RNA Polymerasen

stimuliert (Goldberg et al., 1977). Da das verwendete Rinderserumalbum laut Hersteller eine Molmasse von 68000 besitzt, die stimulierende Aktivität jedoch nur eine Molmasse von ca. 10000 (siehe Seite 83) wird auch dieses Agens neben anderen unbekannten niedermolekularen Verbindungen als stimulierende Aktivität ausgeschlossen.

Die charakterisierte stimulierende Aktivität ist folglich ein niedermolekulares Protein, welches vermutlich basische Eigenschaften zeigt. So bindet die stimulierende Aktivität an Kationenaustauschern, wie Heparinsepharose (Tab. 6) oder Phosphocellulose (Tab. 7), jedoch nicht an Anionenaustauschern, wie DEAE-Sepharose (Fig. 6; oder QAE-Sepharose, ohne Beleg). Die geringe Molmasse von ca. 10000 ist nicht weiter erstaunlich, da bereits bekannte Transkriptionsfaktoren, wie z. B. TF IIA (Molmasse 13000; Samuels & Sharp, 1986) ebenfalls sehr kleine Molmassen aufweisen können und aktiv sind.

Der Nachweis der stimulierenden Aktivität analog der spezifischen *in vitro* Transkription von HeLa Ganzzelextrakten (Manley et al., 1983) abhängig vom Einhalten bestimmter Reaktionsparameter. So darf in einem Standardtranskriptionsansatz die Menge an eingesetzter DNA einen bestimmten Wert nicht überschreiten, sonst wird keine Stimulierung mehr nachgewiesen (Fig. 12). Eine Erklärung dafür ist, daß unter Standardtranskriptionsbedingungen die DNA-Matrize mit RNA Polymerase gesättigt und freie RNA Polymerase noch im Ansatz vorhanden ist, da eine Erhöhung der RNA Polymerase-Konzentration zu keiner Erhöhung der Transkriptionsrate führt. Ein Zusatz

an DNA jedoch erhöht die Transkriptionsrate solange bis die stimulierende Aktivität zum limitierenden Faktor wird. Danach sinkt die Gesamt-RNA-Synthese bis die stimulierende Aktivität nicht mehr sicher nachgewiesen werden kann, da die RNA-Synthese von RNA Polymerase allein ansteigt. Es scheint auch eine untere Schwelle der DNA-Konzentration zu geben, da mit 0,3 pmol im Gegensatz zu 0,9 pmol eines 243 bzw. eines 107 bp langen DNA-Fragments Weizenkeim RNA Polymerase nicht mehr stimulierbar ist (siehe Legende Fig. 20). Erstaunlicherweise ist Weizenkeim RNA Polymerase mit 0,3 pmol eines 476 bp langen DNA-Fragments wieder stimulierbar. Die Voraussetzung einer Mindestmenge an DNA im Ansatz und ein inhibitorischer Effekt bei hohen DNA-Konzentrationen wird interessanterweise auch bei der spezifischen *in vitro* Transkription von HeLa Ganzzellextrakten berichtet (Manley et al., 1983).

Goldberg et al. (1977) berichten, daß limitierende Mengen von RNA Polymerase aus Hefe oder aus *E. coli* durch kleine Konzentrationen an Kalbsthy-mus Histonen stimuliert werden. Das Ausmaß der Stimulierung ist abhängig vom RNA Polymerase/DNA-Verhältnis. Es stellte sich daher die Frage, ob Histone, welche möglicherweise im fraktionierten Kernextrakt enthalten sind, RNA Polymerase aus Weizenkeimen stimulieren. Jedoch ist in meinem Fall die Weizenkeim RNA Polymerase Konzentration nicht limitierend, da unter Standardtranskriptionsbedingungen eine Verdoppelung der Weizenkeim RNA Polymerase-Konzentration im Ansatz weder zu einer Erhöhung der RNA Polymerase-Aktivität, noch zu einer signifikanten Erhöhung der stimulierenden Aktivität führt (Fig. 11). Erst bei einer Verdreifachung der

ursprünglichen RNA Polymerase-Konzentration wird die stimulierende Aktivität nicht mehr sicher nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, daß bei einer direkten Wechselwirkung der stimulierenden Aktivität mit RNA Polymerase überschüssige RNA Polymerase die stimulierende Aktivität bindet, so daß sich vermutlich kein ternärer Komplex aus RNA Polymerase, stimulierender Aktivität und DNA ausbilden kann, sondern nur binäre Komplexe aus freier RNA Polymerase und DNA bzw. RNA Polymerase und stimulierender Aktivität.

Ein weiterer kritischer Parameter beim Nachweis der stimulierenden Aktivität ist die Salzkonzentration im Ansatz. Analog der spezifischen *in vitro* Transkription von HeLa Ganzzelextrakten (Manley et al., 1983) ist die stimulierende Aktivität bei einer Salzkonzentration von ca. 50 mM NaCl nicht mehr nachweisbar (Fig. 13). Die RNA Polymerase-Aktivität bleibt jedoch bei einer Salzkonzentration von ca. 20-50 mM NaCl konstant (Fig. 13). Hier muß erwähnt werden, daß Jendrisak und Burgess (1975) bzw. Dynan und Burgess (1979) in einem RNA Polymerase Aktivitätstest eine Salzkonzentration von 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bzw. NaCl angeben. Bei dieser Konzentration kann die stimulierende Aktivität jedoch nicht mehr sicher nachgewiesen werden. Vermutlich dissoziiert die stimulierende Aktivität infolge schwacher elektrostatischer Wechselwirkungen mit der RNA Polymerase bei Salzkonzentrationen ab ca. 50 mM NaCl vom postulierten ternären Protein-DNA-Komplex ab. Nach einer weiteren Erhöhung der Salzkonzentration auf 90 mM NaCl dissoziiert schließlich auch der binäre Komplex von RNA Polymerase und DNA zu ca. 45% (Fig. 13). An dieser

Stelle muß erwähnt werden, daß die Bildung der Präinitiationskomplexe zeitlich nicht verfolgt werden konnte. Statt dessen wurde eine lineare RNA-Syntheserate von 0 - 15 Minuten in An- und Abwesenheit der stimulierenden Aktivität gemessen (Fig. 18).

Ferner beobachtet man eine lineare Zunahme der Gesamt-RNA-Synthese mit steigender Proteinkonzentration (Fig. 10). Erstaunlicherweise wird nach dem Erreichen der maximalen Aktivität keine Sättigung beobachtet, sondern eine lineare Abnahme der Gesamt-RNA-Synthese. Die Abnahme läßt sich z. B. dadurch erklären, daß ab einer bestimmten Proteinkonzentration die Aktivität möglicherweise im Extrakt vorkommender Inhibitoren meßbar wird, so daß die gemessene Gesamt-RNA Synthese abnimmt. Eine weitere mögliche Erklärung ist, daß ab einer bestimmten Proteinkonzentration die stimulierende Aktivität oder andere DNA bzw. RNA Polymerase bindende Proteine um Bindungsstellen auf der DNA-Matrize und/oder um Bindungsstellen an der RNA Polymerase kompetieren, was eine kompetitive Hemmung der stimulierenden Aktivität zur Folge hätte. Die Konkurrenz verschiedener Proteine um RNA Polymerase Bindungsstellen wird von Ptashne (1988) allgemein als "squelching" bezeichnet.

Untersuchungen an RNA Polymerase Aktivatoren aus Hefe ergaben, daß ein Aktivatorprotein, so bezeichnet bei Ptashne (1988), aus zwei Bereichen besteht. Zum einen eine RNA Polymerase aktivierende Region und zum anderen eine DNA-bindende Region (Ptashne, 1988). Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die von mir beschriebene stimulierende Aktivität in Verbindung

mit RNA Polymerase jede DNA-Matrize, sogar polyd(A-T)-d(A-T), zur Stimulierung verwendet (Tab. 12). Es zeigte sich aber auch, daß die stimulierende Aktivität bestimmte DNA-Fragmente des analysierten Promotorbereichs des Chalconsynthasegens bevorzugt (Fig. 20). Diese selektive Stimulierung ist im Gegensatz zur RNA Polymerase Aktivität allein unabhängig von der Länge der DNA-Matrize (ohne Beleg). Der AT-Gehalt aller untersuchten DNA-Fragmente lag mit einer minimalen Abweichung von 2% und einer maximalen Abweichung von 8% bei durchschnittlich 62% (ohne Beleg). Die stimulierende Aktivität erkennt somit unabhängig vom AT- bzw. GC-Gehalt der DNA-Matrize allein oder in Verbindung mit RNA Polymerase bestimmte Sequenzen auf der DNA-Matrize. Eine Sequenzanalyse des von -111 bis -354 bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt liegenden DNA-Fragments, an dem die Stimulierung selektiv erfolgt, legt nach Sommer und Saedler (1986) zwei regulatorische Bereiche nahe. Der erste regulatorische Bereich enthält die Sequenz GCCAACT, welche dem GG_TCAATCT-Bereich, der sogenannten CAAT-Box, ähnlich ist (Sommer und Saedler, 1986). Dieses Erkennungsmotiv ist ein wichtiges RNA Polymerase II Promotorelement eukaryotischer Gene, an das ein "*bona fide* sequence-specific transcription initiation protein", der sogenannte "CCAAT-binding transcription factor" (CTF) aus HeLa-Zellen bindet (Santoro et al., 1988) und die Transkription *in vitro* und *in vivo* bis zum Zehnfachen der ursprünglichen Aktivität stimuliert (Short, 1987). Der zweite von Sommer und Saedler (1986) beschriebene regulatorische Bereich von -334 bis -320 relativ zum Transkriptionsstartpunkt enthält einen 15 Nukleotide langen Guanin-reichen Bereich, welcher beim Hühner β -Globingen regulatorische Proteine bindet (Emerson

et al., 1985). Für zukünftige Arbeiten wird es sicherlich von Interesse sein, spezifische CCAAT-bindende und/oder an guaninreiche Sequenzen bindende Proteine im fraktionierten Kernextrakt, z. B. mittels Gelretention, nachzuweisen.

Ein weiteres entscheidendes Ergebnis dieser Arbeit ist, daß die von mir charakterisierte stimulierende Aktivität nicht nur eine Abhängigkeit von der DNA-Sequenz, sondern auch eine Abhängigkeit von der Herkunft der verwendeten RNA Polymerase zeigt. So wird *E. coli* RNA Polymerase nicht stimuliert (Tab. 13). Im Gegenteil, die Aktivität der *E. coli* RNA Polymerase wird sogar um knapp die Hälfte inhibiert. Die eukaryotischen RNA Polymerasen aus Weizenkeimen, *N. tabacum* und Kalbsthymus werden hingegen an derselben DNA-Matrize wie mit *E. coli* RNA Polymerase durch fraktionierten Kernextrakt stimuliert. Das ist deshalb so interessant, weil die von Ptashne (1988) beschriebenen RNA Polymerase Aktivatoren *in vivo* in verschiedenen eukaryotischen Zellarten, wie *Drosophila* Larven, Säugerzellen und auch Pflanzenzellen aktiv sind, jedoch nicht in *E. coli*. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf, daß es eine Gruppe universeller eukaryotischer RNA Polymerase Aktivatoren bzw. Stimulatoren gibt, die einen ähnlichen Mechanismus zur Stimulierung besitzen und sowohl bestimmte DNA-Sequenzen, als auch verschiedenen RNA Polymerasen selektiv erkennen. Ebenso wird eine archaebakterielle RNA Polymerase aus *M. vanniellii* stimuliert. Dieses Ergebnis bestätigt zahlreiche Untersuchungen, daß Archaeobakterien eine den eukaryotischen RNA Polymerasen II und III verwandte RNA Polymerase besitzen (Zillig et al., 1988). Der unterschiedliche Grad der Stimu-

lierung an den verschiedenen RNA Polymerasen korreliert nicht mit der Herkunft. So wird durch den fraktionierten Kernextrakt RNA Polymerase aus Kalbsthymus ungefähr doppelt so stark stimuliert wie RNA Polymerase aus Weizenkeimen (Tab. 13). Vermutlich hat ein unterschiedlicher Anreicherungsgrad der verschiedenen RNA Polymerasen und der eingesetzten fraktionierten Kernextrakte einen Einfluß auf die Stimulierung.

Die DNA- und RNA Polymerase-Selektivität der stimulierenden Aktivität (Fig. 20 und Tab. 13) schließt zudem eine Gruppe unspezifisch stimulierender Nicht-Histonproteine aus. Zum einen wird berichtet, daß die "High Mobility Group" (HMG) Proteine 1 und 2 doppelsträngige DNA destabilisieren bzw. entwinden können und somit RNA Polymerase aus HeLa Zellen unspezifisch stimulieren (Tremethick und Molloy, 1986). Zum anderen wird von Rizzo et al. (1978) eine stimulierende Aktivität aus Sojabohnen Zellkernen beschrieben, die jedoch sowohl RNA Polymerase aus Sojabohnen, als auch RNA Polymerase aus *E. coli* zwei- bis dreifach stimuliert und somit mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen stimulierenden Aktivität nicht identisch sein kann.

Über den Mechanismus der stimulierenden Aktivität kann nur spekuliert werden. Als Initiationsfaktor ist die stimulierende Aktivität sicherlich an der Ausbildung eines Präinitiations- oder Initiationskomplexes beteiligt. Vermutlich spielt aufgrund des basischen Charakters (siehe oben) und der Abhängigkeit von der DNA-Matrize (Fig. 20) eine DNA-Erkennungsregion auf dem Protein eine gewisse Rolle. Daneben muß eine RNA Polymerase

Erkennungs- und Stimulierungsregion postuliert werden, die selektiv eukaryotische und archaebakterielle RNA Polymerasen erkennt (Tab. 13). Somit wäre die stimulierende Aktivität in ihrer Struktur und Funktion verwandt mit dem Hefe Aktivator Gal 4 (Ptashne, 1988). Es ist jedoch völlig ungeklärt, ob bei der Stimulierung von RNA Polymerase ein einziges oder mehrere Proteine beteiligt sind, welche nur im Komplex mit RNA Polymerase und DNA voll funktionsfähig sind. So ist aus der Literatur ebenfalls bekannt, daß der genspezifisch stimulierende Transkriptionsfaktor USF mit dem "TATA-Box" bindenden Faktor TF IID kooperativ einen Komplex mit der DNA-Matrize bildet (Sawadogo und Roeder, 1985). Eine bis jetzt noch nicht erwähnte Möglichkeit der Stimulierung von RNA Polymerase ist die Phosphorylierung des Enzyms (Blair, 1988). Markierungsversuche mit [γ - 32 P]ATP in einem Standardtranskriptionsansatz und anschließender Analyse auf einem SDS-Polyacrylamidgel ergeben nur eine radioaktive Markierung von Extraktproteinen. In Anwesenheit von RNA Polymerase wird jedoch keine spezifische Phosphorylierung von RNA Polymerase durch Kinaseaktivitäten im fraktionierten Kernextrakt beobachtet (ohne Beleg).

Es wurde auch die Möglichkeit untersucht, ob die stimulierende Aktivität, ähnlich wie der Transkriptionsfaktor TF IIB (Buratowski et al., 1989) die Bindungsaffinität von RNA Polymerase an die DNA-Matrize verstärkt und so eine höhere Gesamt-RNA Synthese gemessen wird. Erstaunlicherweise verstärkt der fraktionierte Kernextrakt reproduzierbar die Bindung von RNA Polymerase an die DNA-Matrize, jedoch nicht auf dem DNA-Fragment

mit einem höheren Stimulierungsfaktor (Fig. 20), sondern auf einem relativ zum Transkriptionsstart weiter stromaufwärts liegenden DNA-Fragment mit einem geringeren Stimulierungsfaktor (Tab. 14). Ein direkter Zusammenhang von stimulierter RNA Polymerase Aktivität und verstärkter Bindung von RNA Polymerase an die DNA-Matrize ist somit wenig wahrscheinlich.

Gelretentionsanalysen und Exonuklease III Schutzexperimente führten zu dem Ergebnis, daß RNA Polymerase aus Weizenkeimen in Anwesenheit von fraktioniertem Kernextrakt an bestimmte Sequenzen des Chalconsynthasegens verstärkt bindet und diese vor Hydrolyse mit Exonuklease III schützt (Fig. 24). Der Größenunterschied der geschützten Banden H und L bzw. L und M etwa 35 - 36 bzw. 29 - 31 Nukleotide (Tab. 15), welcher nach Chandler und Gralla (1980) ungefähr den durch die RNA Polymerase allein abgedeckten DNA-Bereich entspricht. In Anwesenheit von fraktioniertem Kernextrakt wird somit die Gleichgewichtsbindungskonstante von RNA Polymerase an bestimmte DNA-Bereiche erhöht und folglich diese DNA-Bereiche vor Hydrolyse mit Exonuklease besonders geschützt.

Analysiert man nun die DNA-Sequenz des Chalconsynthasegens, so findet man in dem DNA-Bereich, in dem die 3'-Grenzen der Banden H, L und M liegen, repetitive Sequenzen I - IV, welche durch 27 bis 33 Nukleotide lange DNA-Sequenzen unterbrochen werden (Fig. 25). Dieses Sequenzmotiv kommt auf dem ganzen 746 bp DNA-Fragment nur ein einziges Mal vor. Es ist jedoch auffallend, daß die Länge der Abstände zwischen den repetitiven Elementen (27 - 33 Nukleotide) in etwa einem DNA-Bereich entsprechen,

den Weizenkeim RNA Polymerase vor Hydrolyse mit *Micrococcus* Nuklease schützt (34 Nukleotide; Chandler und Gralla, 1980). Zudem ist es auffallend, daß die repetitiven Sequenzen III und IV zu den Sequenzen I und II invers angeordnet sind (Fig. 25).

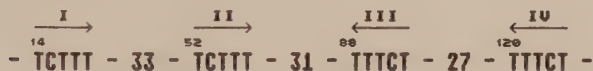


Fig. 25 Sequenzausschnitt aus dem 746 bp langen DNA-Fragment des Chalconsynthasegens

Die dargestellte Sequenz erstreckt sich auf dem Chalconsynthasegen von - 1087 (14) bis - 977 (124) relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Die Numerierung 14 bis 120 oberhalb der dargestellten Sequenz bezieht sich auf die zu erwartende Größe geschützter DNA-Fragmente nach Hydrolyse mit Exonuklease III.

Aus dem Vergleich der Größe und der Größenunterschiede der Banden H, L und M (Tab. 15) mit der geschützten Sequenz des Chalconsynthasegens folgt somit, daß RNA Polymerase II aus Weizenkeimen in Verbindung mit einem oder mehreren Faktoren des fraktionierten Kernextrakts mehrere aufeinanderfolgende repetitive DNA-Sequenzen der Form TCTTT bzw. TTTCT mit 27 bis 33 Nukleotiden Abstand erkennt und bevorzugt an diese Sequenzen bindet.

Von Mitra und An (1989) werden 8 bp lange repetitive Sequenzen ("b" Elemente) des Nopalinsynthasegens beschrieben, welche sowohl in der Sequenz, als auch im Abstand Ähnlichkeit mit der von mir gefundenen repetitiven DNA-Sequenz zeigt (Fig. 25 und 26).

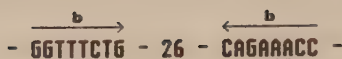


Fig. 26 Sequenzausschnitt aus dem Nopalinsynthasegen

Der dargestellte Sequenzausschnitt erstreckt sich auf dem Nopalinsynthasegen von - 148 bis - 107 relativ zum Transkriptionsstartpunkt (Depicker et al., 1982) und zeigt die von Mitra und An (1989) beschriebenen "b" Elemente. Die unterstrichenen Sequenzen weisen auf die Homologie zu den beschriebenen repetitiven Sequenzen des Chalconsynthasegens hin.

Diese "b" Elemente werden von Ha und An (1989) für die Promotoraktivität und Promotorstärke des Nopalinsynthasegens verantwortlich gemacht. Im Unterschied zu den repetitiven Sequenzen des Chalconsynthasegens (chs) befinden sich die "b" Elemente des Nopalinsynthasegens (nos) in geringerer Entfernung von "CCAAT"- und "TATA"-Box (nos: - 107 bis - 148; chs: - 977 bis - 1087; Depicker et al., 1982; Sommer und Saedler, 1986). Eine mögliche Erklärung für den geringeren Abstand auf dem Nopalinsynthasegen ist, daß der 5'-Bereich des Nopalinsynthasegens bis zur rechten T-DNA Grenze des Ti-Plasmids nur 300 bp lang ist (Depicker et al., 1982) und somit weniger Raum für ausgedehnte regulatorische Bereiche vorhanden ist. In Analogie zu den "b" Elementen kann somit ebenfalls ein Einfluß der gefundenen repetitiven Sequenzen des Chalconsynthasegens auf die Promotorregulation in Zusammenhang mit einer verstärkten RNA Polymerase Bindung postuliert werden.

Unter der Voraussetzung, daß es sich bei den repetitiven Elementen um enhancerverwandte Sequenzen handelt, können diese ohne Berücksichtigung

der Orientierung auf dem Chalconsynthasegen (Fig. 25) in gleicher Orientierung untereinander geschrieben werden. Ein Vergleich der vier repetitiven Sequenzen einschließlich ihrer Randsequenzen führt nun zu der Konsensussequenz $XAX\overset{C}{T}TCTTTA$ (Tab. 16). Diese Konsensussequenz wird mit dem Konsensus der Enhancerkernsequenz (Sassone-Corsi und Borrelli, 1986) verglichen und weist eine 60%ige Homologie auf (Tab. 16). Die Sequenzhomologie mit der Enhancerkernsequenz (Tab. 16) und die Wiederholung des Sequenzmotivs (Fig. 25) weisen somit auf eine enhancerähnliche Funktion hin.

Sequenz I	$TA\overset{C}{A}CTCTTTG$
Sequenz II	$GA\overset{C}{A}CTCTTTA$
Sequenz III	$ATGTTCTTTT$
Sequenz IV	$CAT\overset{C}{T}CTTTA$
Konsensus	$XAX\overset{C}{T}TCTTTA$
Enhancerkern	$XACACC\overset{TT}{AA}TC$
Übereinstimmung	$++---++++-$

Tab. 16 Vergleich der repetitiven Sequenzen mit dem "enhancer core" Motiv

Zum Vergleich der Konsensussequenz der repetitiven Sequenzen des Chalconsynthasegens mit dem "enhancer core" Motiv wurden die Sequenzen aus Fig. 25 einschließlich ihrer Randbereiche untereinander dargestellt und bei einer Homologie größer als 50% als Konsensus bezeichnet. Das Symbol X bedeutet keine gefundene Übereinstimmung. Die Sequenz III und IV wurde in umgekehrter Orientierung als auf dem Chalconsynthasegen angeordnet dargestellt (siehe Text).

Nähere Informationen über die Funktion dieser repetitiven Elemente können jedoch nur *in vivo* Expressionsanalysen von Promotormutanten der repetitiven Elemente liefern.

In diesem Zusammenhang ist es auch wichtig zu erwähnen, daß die Erhöhung der Zink-Konzentration eine Verstärkung der Bindung von RNA Polymerase an die DNA-Matrize bewirkt (Fig. 21). Dies ist deshalb erstaunlich, da RNA Polymerase II aus Weizenkeimen bereits einen im Vergleich zu *E. coli* RNA Polymerase und Hefe RNA Polymerase I und II hohen Gehalt an fest gebundenem Zink besitzt (Petranyi et al., 1977). Zink als Ursache für eine verstärkte Bindung von RNA Polymerase an die repetitiven Elemente des Chalconsynthasegens kann jedoch ausgeschlossen werden, da die fraktionierten Kernextrakte gegen zinkfreien Elutionspuffer (siehe Material und Methoden) dialysiert wurde.

Die Genregulation des Chalconsynthasegens unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wirft die Frage auf, wie die RNA Polymerase mit Hilfe von einem oder mehreren Transkriptionsfaktoren in einem Bereich von ca. 970 - 1090 bp stromaufwärts verstärkt bindet und in einem Bereich von ca. 110 - 350 bp stromaufwärts stimuliert wird. Nach Ptashne (1986) kann folgendes Modell zur Erklärung herangezogen werden: Die RNA Polymerase bindet mit Hilfe von einem oder mehreren Transkriptionsfaktoren an definierte repetitive DNA-Sequenzen, um dann entlang der DNA an spezifische stromabwärts liegende DNA-Sequenzen zu gleiten ("sliding"-Modell). Dort wird die Transkriptionsreaktion nach Ausbildung eines aktiven Transkriptionskomplexes verstärkt initiiert.

Im Widerspruch zu diesem Modell steht der experimentelle Befund, daß das DNA-Fragment, welches den gesamten sequenzierten Promotor des

Chalconsynthasegens enthält keinen größeren Stimulierungsfaktor besitzt als die DNA-Fragmente, welche nur Ausschnitte des Promotors beinhalten (Fig. 20). Eine interessante Erklärung für diese Beobachtung ist, daß Lawton et al. (1988) durch 5'-Deletionen des Chalconsynthasepromotors und anschließender Expressionsanalyse eines chimären Gens in Pflanzenprotoplasten auf dem Chalconsynthasegen einen Silencer zwischen - 173 und - 326 relativ zum Transkriptionsstart gefunden hat. Silencergebundene Proteine des Kernextrakts könnten so ein Entlanggleiten der RNA Polymerase auf der DNA-Matrize verhindern. Dies würde bedeuten, daß der Kernextrakt nicht nur Proteine enthält, die an stimulierend wirkende Sequenzen binden, sondern auch Proteine, die an Silencersequenzen binden.

ANHANG

Einfluß antimikrobieller Agentien auf die RNA Polymerase Aktivität

MACARPIN, CHELIRUBIN UND SANGUINARIN

Der Befall von Pflanzen mit Pflanzenpathogenen induziert in der Pflanzenzelle mehrere Abwehrmechanismen, von denen die Akkumulation von niedermolekularen antimikrobiellen Substanzen, den sogenannten Phytoalexinen am meisten untersucht ist (Lamb et al., 1989). So beobachtete auch Schumacher et al. (1987) nach einer *Penicillium*-Infektion einer pflanzlichen Zellkultur des Stammes *Eschscholtzia californica* eine Rotfärbung der Zellsuspensionskultur. Diese Färbung wird durch eine stimulierte Biosynthese des Benzo[c]phenanthridin-Alkaloids Macarpin hervorgerufen, wobei Macarpin nicht nur die Zellkultur rot färbt, sondern auch die Zellkerne (Liebing, 1988).

Auf Anregung von Prof. Dr. M. H. Zenk und in Zusammenarbeit mit E. Liebing wurde daher die Frage untersucht, ob die Benzo[c]phenanthridine Macarpin, Chelirubin und Sanguinarin einen Einfluß auf die DNA-abhängige RNA Synthese von RNA Polymerase aus Weizenkeimen und aus *E. coli* hat.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde in mehreren Versuchsreihen die Gesamt-RNA Synthese von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen oder aus *E. coli* (Holoenzym; angereichert nach Burgess und Jendrisak, 1975) in

einem Standardtranskriptionsansatz in Anwesenheit von 0 - 340 μM Macarpin, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt. Ferner wurde die Aktivität von RNA Polymerase aus Weizenkeimen in Anwesenheit von Sanguinarin und Chelirubin bei der halbmaximalen Hemmkonzentration von Macarpin bestimmt.

Das Ergebnis dieser Versuche war, daß mit RNA Polymerase aus Weizenkeimen die RNA Synthese bereits bei 40 μM Macarpin vollständig gehemmt wird (Fig. 27). Halbmaximale Hemmung wird bei ca. 2,5 μM Macarpin beobachtet. Im Gegensatz dazu wird eine halbmaximale Hemmung von *E. coli* RNA Polymerase erst bei ca. 45 μM Macarpin beobachtet (Fig. 27). Selbst bei 170 μM Macarpin wird immer noch eine Aktivität von 16% gemessen.

Eine mögliche Erklärung des Unterschieds ist, daß *E. coli* RNA Polymerase (Holoenzym) auf der DNA-Matrize Promotorsequenzen erkennt und erst nach Bindung des Alkaloids an diese Promotoren eine Inhibierung von *E. coli* RNA Polymerase gemessen werden kann. Im Gegensatz dazu erkennt Weizenkeim RNA Polymerase *in vitro* keine spezifischen Promotoren, sondern bindet wenig selektiv an die DNA-Matrize (Mosig et al., 1985), so daß bereits bei niedrigen Alkaloidkonzentrationen eine Inhibierung gemessen wird.

Eine Voraussetzung für diese Erklärung ist, daß bei Macarpinkonzentrationen kleiner als 40 μM die DNA-Matrize nicht vollständig mit dem Alkaloid belegt ist. Um dies zu prüfen wurde exemplarisch der Belegungsgrad der eingesetzten DNA-Matrize mit Alkaloid berechnet. Als Alkaloid wurde

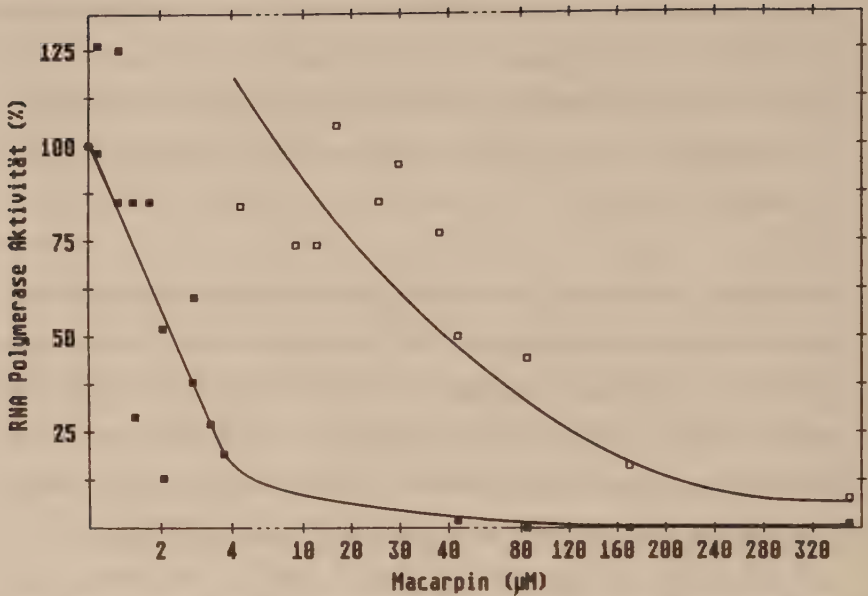


Fig. 27 Inhibition von RNA Polymerase aus Weizenkeimen und aus *E. coli* mit Macarpin

In mehreren Versuchsreihen wurden 0 - 340 μM Macarpin in einem Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) zusammen mit je 0,6 μg RNA Polymerase II aus Weizenkeimen (■) bzw. 1,0 μg RNA Polymerase aus *E. coli* (□) und je 0,24 μg eines 9,6 kb langen Plasmids pAm3 (Sommer und Saedler, 1986), welches 3,0 kb des Chalconsynthasegens enthält, 15 Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von Ribonukleosidtriphosphaten gestartet und bei 30 °C 15 Minuten inkubiert. Die Ansätze enthielten zusätzlich noch 13 bzw. 15% Dimethylsulfoxid. Die Gesamt-RNA-Synthese wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt. 100% Weizenkeim RNA Polymerase-Aktivität entsprechen einer Einbaurrate von 1,2 - 2,1 pmol (α - ^{32}P)UTP/15 min und 100% *E. coli* RNA Polymerase-Aktivität einer Einbaurrate von 3,5 bzw. 4,5 pmol (α - ^{32}P)UTP/15 min.

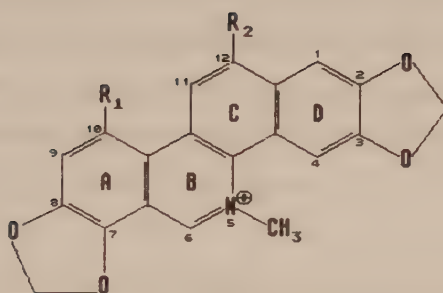
Daunomycin gewählt, da die Bindungskonstante von Daunomycin an *E. coli* DNA (50% GC-Gehalt) bekannt ist (Chaires et al., 1987) und Daunomycin Weizenkeim RNA Polymerase vergleichbar stark inhibiert wie Macarpin (Fig. 27 und 31). Die Berechnung ergibt, daß mit einer Gleichgewichtsbindungskonstante von $K_B = 7,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Chaires et al., 1987) bei 2,5 μM Alkaloid die DNA-Matrize zu 31% und bei 40 μM Alkaloid zu 96% belegt ist. Die Annahme, daß die DNA-Matrize bei Alkaloidkonzentrationen kleiner als 40 μM nicht vollständig belegt ist, ist somit richtig. Ebenso korreliert der Belegungsgrad der DNA-Matrize mit der beobachteten Inhibierung von Weizenkeim RNA Polymerase durch Alkaloid. Interessanterweise verringert sich jedoch die *E. coli* RNA Polymerase Aktivität durch alkaloidgesättigter DNA (45 μM Alkaloid) erst um 50% und eine vollständige Inhibierung wird erst bei einer ca. 10fach höheren Konzentration beobachtet (Fig. 27). Dies ist ein Hinweis, daß Macarpin ähnlich dem Daunomycin (Chaires et al., 1987) eine sequenzselektive Bindungsaffinität an die DNA besitzt, die jedoch unter diesen Voraussetzungen verschieden von der sequenzspezifischen Promotorbindung von *E. coli* RNA Polymerase sein muß. Die Gleichgewichtsbindungskonstante von Macarpin setzt sich somit aus mindestens zwei Komponenten zusammen. Zum einen gibt es eine sequenzselektive Bindungskonstante und zum anderen eine sequenzunspezifische Bindungskonstante, die viel kleiner sein muß, als die Gleichgewichtsbindungskonstante von *E. coli* RNA Polymerase an DNA. Folglich wird die *E. coli* RNA Polymerase erst bei sehr viel höheren Macarpinkonzentrationen gehemmt als Weizenkeim RNA Polymerase.

Vergleicht man nun die Aktivität von RNA Polymerase aus Weizenkeimen in Anwesenheit von je 2,5 μ M Macarpin, Chelirubin und Sanguinarin, so erkennt man, daß Chelirubin wie Macarpin die RNA Polymerase zu ca. 50% hemmt (Tab. 17). Im Gegensatz dazu hemmt Sanguinarin bei der gleichen Konzentration RNA Polymerase nur um 18% (Tab. 17). Dies ist insofern interessant, da Sanguinarin im Gegensatz zu Macarpin und Chelirubin an der Position 10 und 12 nicht methoxysubstituiert ist (Fig. 28) und Liebing (1988) bereits zeigte, daß Macarpin an DNA bindet. Eine mögliche Ursache für die geringere Hemmung der RNA Polymerase-Aktivität durch Sanguinarin könnte somit eine schwächere Bindung des Alkaloids an die DNA-Matrize sein.

RNA Polymerase-Aktivität (%) in Anwesenheit von	
—	100
Macarpin	52
Chelirubin	46
Sanguinarin	82

Tab. 17 Inhibierung von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen mit Macarpin, Chelirubin und Sanguinarin

In einer Versuchsreihe wurden je 2,5 μ M Macarpin, Chelirubin und Sanguinarin in einem Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) zusammen mit je 0,6 μ g RNA Polymerase II aus Weizenkeimen und je 0,24 μ g eines 9,6 kb langen Plasmids pAm3 (siehe oben) 15 Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Ribonukleosidtriphosphaten gestartet und bei 30 °C 15 Minuten inkubiert. Parallel dazu wurde RNA Polymerase aus Weizenkeimen ohne Alkaloid 15 Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Die Ansätze enthielten ferner 10% Dimethylsulfoxid. Die Gesamt-RNA-Synthese wurde wie in Material und Methoden beschrieben quantitativ bestimmt. 100% RNA Polymerase-Aktivität entsprechen einer Einbaurrate von 0,5 pmol (α -³²P)UTP/15 min.



Name	R ₁	R ₂
Sanguinarin	H	H
Chelirubin	CH ₃ O	H
Macarpin	CH ₃ O	CH ₃ O

Fig. 28 Struktur von Benzo[c]phenanthridin Alkaloide

Um dieser Frage nachzugehen, wurde bei dem pH-Wert der Transkriptionsreaktion die Entfärbung der Alkaloid-DNA-Komplexe in einem Agarosegel durch das Anlegen eines elektrischen Feldes untersucht. Freie Alkaloide wandern aufgrund ihrer positiven Ladung in Richtung Kathode, DNA-gebundene Alkaloide wie DNA jedoch aufgrund der negativen Überschußladung der DNA in Richtung Anode.

Der Versuch zeigt, daß im Laufe der Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel der Sanguinarin-DNA-Komplex vollständig entfärbt wird (Fig. 29). Macarpin- bzw. Chelirubin-DNA-Komplexe werden hingegen nicht vollständig elektrophoretisch entfärbt.

Aus diesem Experiment wird geschlossen, daß aufgrund einer kleineren Gleichgewichtsbindungskonstante von Sanguinarin im zeitlichen Mittel die DNA weniger Sanguinarin gebunden hat als Macarpin bzw. Chelirubin und somit Sanguinarin RNA Polymerase aus Weizenkeimen nur wenig inhibieren kann.

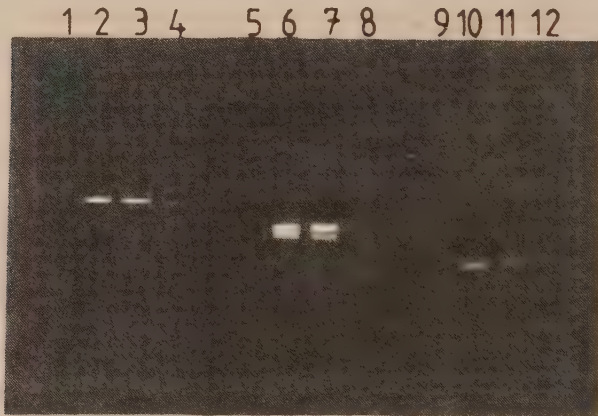


Fig. 29 Elektrophoretische Entfärbung von Benzol(c)phenanthridin-DNA-Komplexen

In einer Versuchsreihe wurden je 1 µg Macarpin, Chelirubin und Sanguinarin in einem 6 µl Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) ohne RNA Polymerase und ohne Ribonukleosidtriphosphate zusammen mit je 1.1 µg Plasmid pAm3 (siehe oben) 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Parallel dazu wurde 1.1 µg Plasmid-DNA ohne Alkaloid bei 30 °C 15 Minuten in einem 6 µl Standardtranskriptionsansatz inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit Gelladepuffer versetzt und auf ein 0,8%iges Agarosegel bei 4 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Die Alkaloid-DNA-Komplexe wurden durch Fluoreszenz bei Bestrahlung mit 254 nm sichtbar gemacht.

- | | |
|----------|---|
| 1 - 4: | ca. $\frac{1}{2}$ h lange Elektrophorese |
| 5 - 8: | ca. 1 h lange Elektrophorese |
| 9 - 12: | ca. $1\frac{1}{2}$ h lange Elektrophorese |
| 1, 5, 9 | Ansatz ohne Alkaloid |
| 2, 6, 10 | Ansatz mit Macarpin |
| 3, 7, 11 | Ansatz mit Chelirubin |
| 4, 8, 12 | Ansatz mit Sanguinarin |

Für eine starke DNA-Benzoc[*l*]phenanthridin-Bindung und somit für eine starke Hemmung von RNA Polymerase durch mikromolare Mengen der Alkaloide Macarpin und Chelirubin ist folglich neben einer polycyclischen aromatischen Struktur und einer positiven Ladung am quartären Stickstoff eine Methoxygruppe an Position 10 des Benzoc[*l*]phenanthridin-Gerüsts notwendig.

DAUNOMYCIN

Eine der am besten charakterisierten DNA-intercalierenden Substanzen ist Daunomycin (Hartmann et al., 1968). Daunomycin ist ein Anthracyclin-Antibiotikum (Fig. 30), welches an spezifische DNA-Sequenzen in die DNA intercaliert (Chaires et al., 1987). Es war daher interessant zu untersuchen, ob Daunomycin in einem Standardtranskriptionsansatz die gleiche inhibitorische Wirkung auf RNA Polymerase zeigt wie die oben untersuchten Benzoc[*l*]phenanthridine.

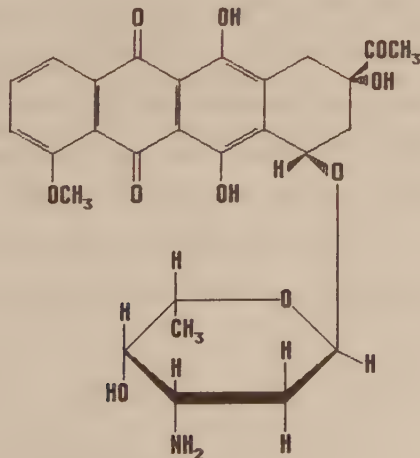


Fig. 30 Struktur von Daunomycin

Zur Beantwortung dieser Frage wurde in zwei verschiedenen Versuchsreihen RNA Polymerase aus Weizenkeimen oder aus *E. coli* zusammen mit 0 - 330 μM Daunomycin in einem Standardtranskriptionsansatz 15 Minuten bei 30 °C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Ribonukleosidtriphosphaten gestartet. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 30 °C wurde die Gesamt-RNA-Synthese, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt.

Die Versuche zeigen, daß Daunomycin RNA Polymerase aus Weizenkeimen und aus *E. coli* vergleichbar stark inhibieren (Fig. 31), wobei die halbmaximale Hemmkonzentration von Daunomycin mit *E. coli* RNA Polymerase etwas höher liegt (7 μM) als mit Weizenkeim RNA Polymerase (2 μM). Vergleicht man die halbmaximale Hemmkonzentration von Daunomycin und Macarpin miteinander, so erkennt man, daß mit Weizenkeim RNA Polymerase die halbmaximale Hemmkonzentrationen ähnlich sind (2 μM bzw. 2,5 μM), mit *E. coli* RNA Polymerase jedoch voneinander abweichen (7 μM bzw. 45 μM).

Das Anthracyclin-Antibiotikum Daunomycin hemmt somit die eukaryotische RNA Polymerase aus Weizenkeimen im gleichen mikromolaren Bereich wie die Benzofc]phenanthridine Macarpin und Chelirubin. Hier ist es wichtig zu wissen, daß die RNA Polymerase-hemmende Wirkung von Daunomycin durch eine Intercalation des Antibiotikums in die DNA-Matrize erklärt wird (Chaires et al., 1987). Da Daunomycin im gleichen mikromolaren Bereich wie Macarpin und Chelirubin RNA Polymerase aus Weizenkeimen

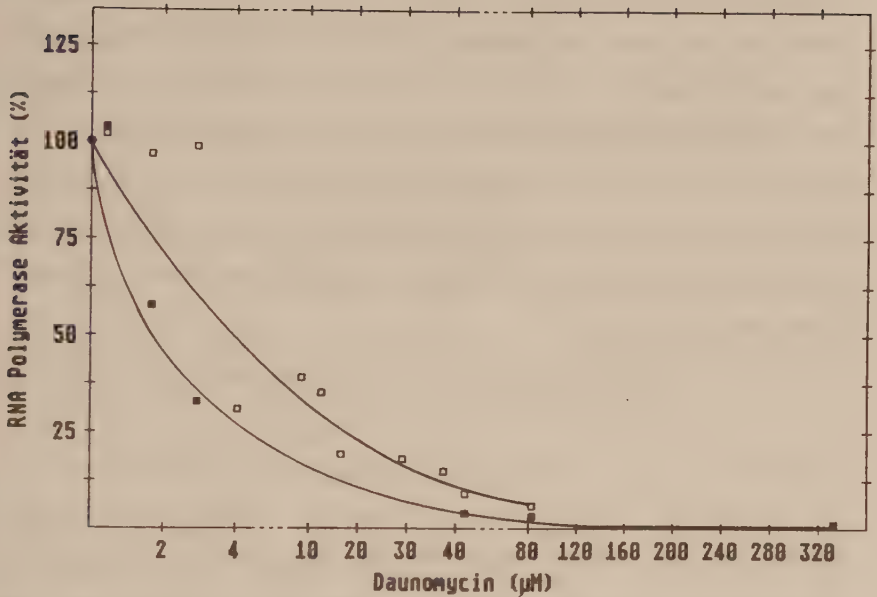


Fig. 31 Inhibierung von RNA Polymerase aus Weizenkeimen und aus *E. coli* mit Daunomycin

In mehreren Versuchsreihen wurden 0 - 330 µM Daunomycin in einem Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) zusammen mit je 0,6 µg RNA Polymerase II aus Weizenkeimen (■) bzw. 1,0 µg RNA Polymerase aus *E. coli* (□) und 0,24 µg des Plasmids pAm3 (siehe oben) 15 Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von Ribonukleosidtriphosphaten gestartet und bei 30 °C 15 Minuten inkubiert. Die Ansätze enthielten ferner 15% Dimethylsulfoxid. Die Gesamt-RNA-Synthese wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt. 100% Weizenkeim RNA Polymerase-Aktivität entsprechen einer Einbaurrate von 2,7 pmol (α - 32 P)UTP/15 min und 100% *E. coli* RNA Polymerase-Aktivität einer Einbaurrate von 9,0 - 9,9 pmol (α - 32 P)UTP/15 min.

inhibiert, kann man schließen, daß der Mechanismus der Inhibierung der gleiche ist und zwar Intercalation in die DNA-Matrize. Dieser Befund steht in Einklang mit den oben beschriebenen Versuchen zur Entfärbung von DNA-Benzofc]phenanthridin-Komplexen. Da Daunomycin ferner für die Krebs-Chemotherapie von klinischem Interesse ist (Chaires et al., 1987), wird es sicherlich in Zukunft von großem Interesse sein, eine mögliche anti-cancerogene Wirkung der Pflanzen-Alkaloide Macarpin und Chelirubin nachzuweisen.

THIOLUTIN

Der Mechanismus der RNA Polymerase-hemmenden Wirkung von Thiolutin (Fig. 32) als eine weitere antimikrobiell wirkende Substanz ist mit RNA Polymerase I, II und III aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) bereits bekannt und völlig verschieden von dem Mechanismus von Daunomycin. Thiolutin bindet nämlich an die RNA Polymerase selbst und nicht an die DNA-Matrize (Tipper, 1973).

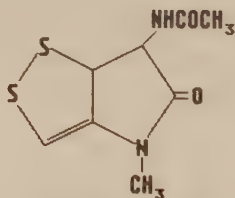


Fig. 32 Struktur von Thiolutin

Es war daher von Interesse, ob Thiolutin auf die Aktivität von RNA Polymerase aus Weizenkeimen die gleiche inhibitorische Wirkung ausübt wie auf RNA Polymerase aus *S. cerevisiae*. Folglich wurde in einer Versuchsreihe in einem Standardtranskriptionsansatz 74 - 1087 μM Thiolutin mit RNA Polymerase II aus Weizenkeimen 15 Minuten bei 30 °C vorinkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von polyd(A-T)·d(A-T) als DNA-Matrize und von Ribonukleosidtriphosphaten gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 30 °C wurde die Gesamt-RNA-Synthese, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt.

Die Auswertung der Versuchsreihe ergibt, daß RNA Polymerase aus Weizenkeimen bei einer 1087 μM Thiolutin-Konzentration erst zu 50% im Vergleich zur Aktivität ohne Thiolutin gehemmt wird (Tab. 18). RNA Polymerase aus *S. cerevisiae* wird im Gegensatz dazu bereits bei einer 13 μM Thiolutin-Konzentration zu 50% gehemmt (Tipper, 1973).

RNA Polymerase II aus Weizenkeimen ist somit gegenüber Thiolutin ca. 100fach unempfindlicher als RNA Polymerase aus *S. cerevisiae*, so daß ein ähnlicher inhibierender Mechanismus von Thiolutin wie bei der RNA Polymerase aus *S. cerevisiae* bei Weizenkeim RNA Polymerase II ausgeschlossen werden kann.

Thiolutin (μ M)	RNA Polymerase- Aktivität (%)
—	100
74	78
361	77
726	75
1087	54

Tab. 18 Inhibierung von RNA Polymerase II aus Weizenkeimen mit Thiolutin

In einer Versuchsreihe wurden 74 - 1087 μ M Thiolutin in einem Standardtranskriptionsansatz (siehe Material und Methoden) zusammen mit je 0,6 μ g RNA Polymerase II aus Weizenkeimen ohne DNA-Matrize 15 Minuten bei 30 °C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von polyd(A-T)·d(A-T) als DNA-Matrize und Ribonukleosidtriphosphaten gestartet. Parallel dazu wurde 0,6 μ g RNA Polymerase ohne Thiolutin 15 Minuten bei 30 °C vorinkubiert und die Reaktion, wie bereits beschrieben, gestartet. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 30 °C wurde die Gesamt-RNA-Synthese, wie in Material und Methoden beschrieben, quantitativ bestimmt. Der Gehalt an Dimethylsulfoxid betrug in jedem Ansatz 25% und 100% RNA Polymerase Aktivität entspricht einer Einbaurrate von 16,1 pmol (445554 cpm) (α -³²P)UTP/15 min.

Literatur

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1987)
Anaysis of Proteins in *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 10.0.1 - 10.16.10 John Wiley & Sons New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
- Berger, S. L. & Birkenmeier, C. S. (1979)
Inhibition of Intractable Nucleases with Ribonucleoside-Vanadyl Complexes: Isolation of Messenger Ribonucleic Acid from Resting Lymphocytes
Biochemistry **18**, 5143 - 5149
- Blair, D. G. R. (1988)
Eukaryotic RNA Polymerases
Comp. Biochem. Physiol. **89B**, 647 - 670, No. 4
- Bohmann, D., Keller, W., Dale, T., Schöler, H. R., Tebb, G. & Mattay, I. W. (1987)
A transcription factor which bind to the enhancers of SV40, immunoglobulin heavy chain and U2 snRNA genes
Nature (Lond.) **325**, 268 - 272
- Bösl, R. (1986)
Kinetik der Dinukleotidsynthese an der RNA Polymerase B (II) aus Weizenkeimen
Diplomarbeit der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Brack, R. (1983)
In Vitro Transcription of the Escherichia Coli Plasmid pBR322 with RNA Polymerase From Micrococcus Luteus
Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Bradford, M. M. (1976)
A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding
Anal. Bioch. **72**, 248 - 254
- Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P. & Tjian, R. (1986)
Purification and Biochemical Characterization of the Promoter-Specific Transcription Factor, Sp1
Science **234**, 47 - 52

- Bucher, Ph. & Trifonov, E. N. (1986)
Compilation and analysis of eukaryotic POL II promoter sequences
Nucleic Acids Res. **14**, 10009 - 10026, No. 24
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L. & Sharp, Ph. A. (1989)
Five Intermediate Complexes in Transcription Initiation by RNA Polymerase II
Cell **56**, 549 - 561
- Burgess, R. R. & Jendrisak, J. J. (1975)
A Procedure for the Rapid, Large-Scale Purification of *Escherichia coli* DNA-Dependent RNA Polymerase Involving Polymin P Precipitation and DNA-Cellulose Chromatography
Biochemistry **14**, 4634 - 4638, No. 21
- Carthew, R. W., Chodosh, L. A. & Sharp, Ph. A. (1985)
An RNA Polymerase II Transcription Factor Binds to an Upstream Element in the Adenovirus Major Late Promoter
Cell **43**, 439 - 448
- Chaires, J. B., Fox, K. R., Herrera, J. E., Britt, M. & Waring, M. J. (1987)
Site and Sequence Specificity of the Daunomycin-DNA Interaction
Biochemistry **26**, 8227 - 8236
- Chambon, Pierre (1974)
Eucaryotic RNA Polymerases
The Enzymes **10**, 261 - 331
- Chandler, D. W. & Gralla, J. (1980)
Specific Binding and Protection of Form II SV40 Deoxyribonucleic Acid by Ribonucleic Acid Polymerase II from Wheat Germ
Biochemistry **19**, 1604 - 1612
- Cooke, R. M., Durand, R., Job, C., Penon, P., Teissere, M. & Job, D. (1984)
Enzymatic properties of plant RNA polymerases
Plant Mol. Biol. **3**, 217 - 225
- Davidson, J. N. (1970)
Nucleases and Related Enzymes
in *The Biochemistry of the Nucleic Acids* (Davidson J. N. ed.), pp. 192 - 193,
Chapman and Hall and Science Paperbacks, London
- Davies, R. W. (1985)
DNA Sequencing
in *Gel electrophoresis of nucleic acids* (Rickwood, D. & Hames, B. D., eds),
pp. 117 - 172, IRL PRESS, Oxford, Washington DC

- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. & Goodman, H. M. (1982)
Nopaline Synthase: Transcript Mapping and DNA Sequence
J. Molec. Appl. Genet. **1**, 561 - 573
- Duda, C. T. (1976)
Plant RNA Polymerases
Ann. Rev. Physiol. **27**, 119 - 132
- Dynan, W. S. & Burgess, R. R. (1979)
In Vitro Transcription by Wheat Germ Ribonucleic Acid Polymerase II:
Effects of Heparin and Role of Template Integrity
Biochemistry **18**, 4581 - 4588, No. 21
- Emerson, B. M., Lewis, C. D. & Felsenfeld, G. (1985)
Interaction of specific nuclear factors with the nuclease-hypersensitive
region of the chicken adult β -globin gene: nature of the binding domain
Cell **41**, 21 - 30
- Flynn, P. A., Davis, E. A. & Ackerman, S. (1987)
Partial purification of plant transcription factors. II. An *in vitro* transcrip-
tion system is inefficient
Plant Mol. Biol. **9**, 159 - 169
- Fox, C. F., Gumpert, R. I. & Weiss, S. B. (1965)
The Enzymatic Synthesis of Ribonucleic Acid
J. Biol. Chem. **240**, 2101 - 2109, No. 5
- Fried, M. & Crothers, D. M. (1981)
Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacryl-
amide gel electrophoresis
Nucleic Acids Res. **9**, 6505 - 6526, No. 23
- Goldberg, M. I., Perriard, J.-C. & Rutter, W. J. (1977)
A Protein Cofactor That Stimulates the Activity of DNA-Dependent
RNA Polymerase I on Double-Stranded DNA
Biochemistry **16**, 1648 - 1654, No. 8
- Ha, S.-B. & An, G. (1989)
Cis-acting regulatory elements controlling temporal and organ-specific
activity of nopaline synthase promoter
Nucleic Acids Res. **17**, 215 - 223
- Hartmann, G., Behr, W., Beissner, K.-A., Honikel, K. & Sippel, A. (1968)
Antibiotika als Hemmstoffe der Nucleinsäure- und Proteinsynthese
Angew. Chem. **80**, 710 - 718, No. 18

- Heinrich, P. (1987) Klonierung und Sequenzierung von Rifampicin-Resistenzgenen
Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Hinrichsen, A. I., Ortner, I. M. & Hartmann, G. R. (1985)
Synthesis of Dinucleoside Tetraphosphates by RNA Polymerase B(II) from Calf Thymus
FEBS Lett. **193**, 199 - 202
- Huet, J., Buhler, J.-M., Sentenac, A. & Fromageot, P. (1977)
Characterization of Ribonuclease H Activity Associated with Yeast RNA Polymerase A
J. Biol. Chem. **252**, 8848 - 8855, No. 24
- Humphreys, G. O., Willshaw, G. A. & Anderson, E. S. (1975)
A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA
Biochim. Biophys. Acta **383**, 457 - 463
- Hurlbert, R. B. (1957)
Preparation of Nucleoside Diphosphates and Triphosphates
Methods Enzymol. **III**, 785 - 805
- Jendrisak, J. J. & Burgess, R. R. (1975)
A New Method for the Large-Scale Purification of Wheat Germ DNA-Dependent RNA Polymerase II
Biochemistry **14**, 4639 - 4645, No. 21
- Jervis, L. (1974a)
Partial Purification and Characterization of Two *Nicotiana Tabacum* Leaf Ribonucleases
Phytochemistry **13**, 709 - 714
- Jervis, L. (1974b)
Affinity Chromatography of *Nicotiana Tabacum* Ribonucleases
Phytochemistry **13**, 723 - 727
- Johnston, D. E. & McClure, W. R. (1976)
Abortive Initiation of In Vitro RNA Synthesis on Bacteriophage λ DNA in RNA Polymerase (Losick, R. & Chamberlin, M., eds.), pp. 413 - 428, Cold Spring Harbor Laboratory
- Laemmli, U. K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage
Nature (Lond.) **227**, 680 - 685
- Lamb, Chr. J., Lawton, M. A., Dron, M. & Dixon, R. A. (1989)
Signals and Transduction Mechanisms for Activation of Plant Defenses against Microbial Attack
Cell **56**, 215 - 224

- Lawton, M. A., Kragh, K., Jenkins, S. M., Dron, M., Clouse, S.D., Dixon, R. A. & Lamb C. J. (1988)
Nuclear Protein Binding To A *Cis*-acting Silencer In A Defense Gene Promoter
J. Cell Biochem. Suppl. **12C**, 222
- Lewis, M. K. & Burgess, R. R. (1980)
Transcription of Simian Virus 40 DNA by Wheat Germ RNA Polymerase II
J. Biol. Chem. **255**, 4928 - 4936, No. 10
- Liebing, E. (1988)
Untersuchungen zur Kompartimentierung der Alkaloide in Zellkulturen von *Eschscholtzia californica* Cham. und antimikrobielle Wirkungsmechanismen dieser Alkaloide
Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Linsmaier, E. M. & Skoog, F. (1965)
Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures
Physiol. Plant. **18**, 100 - 127
- Lizardi, P. M. (1981)
Binding and Recovery of DNA and RNA unsig S&S NA-45 DEAE Membrane in *Sequences* No. 364 (Firmenschrift der Fa. Schleicher & Schuell GmbH, Dassel)
- Lewin, B. (1985)
Promoters: The Sites for Controlling Initiation
Genes II, pp. 182 - 205, John Wiley & Sons, New York, Chichester Brisbane, Toronto, Singapore
- Manley, J. L., Fire, A., Samuels, M. & Sharp, Ph. A. (1983)
In Vitro Transcription: Whole-Cell Extract
Methods Enzymol. **101** pt. C, 568 - 582
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning. A laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory New York
- Maier, U.-G., Brown, J. W. S., Toloczky, C. & Feix, G. (1987)
Binding of a nuclear factor to a consensus sequence in the 5'flanking region of zein genes from maize
EMBO J. **6**, 17 - 22, No. 1
- Mans, R. J. (1973)
RNA Polymerases in Higher Plants
in *Methods in Molecular Biology* (Laskin, A. L. and Last, J. A., eds) Vol. 4, pp. 93 - 125, Marcel Dekker, Inc., New York

- Matsui, T., Segall, J., Weil, P. A. & Roeder, R. G. (1980)
Multiple Factors Required for Accurate Initiation of Transcription by
Purified RNA Polymerase II
J. Biol. Chem. **255**, 11992 - 11996, No. 24
- McEntee, K., Weinstock, G. M. & Lehman, I. R. (1980)
recA protein-catalyzed strand assimilation: Stimulation by *Escherichia coli*
single-stranded DNA-binding protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 857 - 861, No. 2
- Mennes, A. M., Bouman, H., van der Burg, M. P. M. & Libbenga, K. R. (1978)
RNA Synthesis in Isolated Tobacco Callus Nuclei, and the Influence of
Phytohormones
Plant Sci. Lett. **13**, 329 - 339
- Mitra, A. & An, G. (1988)
Functional Analysis Of Upstream Elements Necessary For Nopaline Synthase
Gene Expression
J. Cell. Biochem. Suppl. **12C**, 173
- Moore, S. (1981)
Pancreatic DNase
in *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.) Vol. XIV A, 281 - 296, Academic Press,
New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco
- Mosig, H., Schäffner, A. R., Sieber, H. & Hartmann, G. R. (1985)
Primer-independent Abortive Initiation by Wheat Germ RNA Polymerase B(II)
Eur. J. Biochem. **149**, 337 - 343
- Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980)
Rapid isolation of high molecular weight plant DNA
Nucleic Acids Res. **8**, 4321 - 4325, No. 19
- Ou-Lee, T.-M., Turgeon, R. & Wu, R. (1988)
A Tissue-Specific Factor That Binds to the Upstream Region of a Rice
 α -Amylase Gene *in vitro*
J. Cell Biochem. Suppl. **12C**, 195
- Petranyi, P., Jendrisak, J. J. & Burgess, R. R. (1977)
RNA Polymerase II from Wheat Germ Contains Tightly Bound Zinc
Biochem. Biophys. Res. Commun. **74**, 1031 - 1038, No. 3
- Pharmacia Fine Chemicals (1979)
Batch-Prozesse in
Sephadex-Ionenaustauscher Leitfaden zur Ionenaustausch-Chromatographie
(Pharmacia Fine Chemicals AB, ed.) p. 46, Pharmacia Fine Chemicals AB
Uppsala, Schweden

- Price P. A. (1972)
Characterization of Ca^{2+} and Mg^{2+} Binding to Bovine Pancreatic Deoxy-
ribonuclease A
J. Biol. Chem. **247**, 2895 - 2899
- Ptashne, M (1986)
Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance
Nature **322**, 697 - 701
- Ptashne, M (1988)
How eukaryotic transcriptional activators work
Nature **335**, 683 - 689
- Rizzo, P. J., Pederson, K. & Cherry, J. H. (1978)
Transcription And RNA Polymerase Stimulatory Activity In Nuclei Isolated
From Soybean
Plant Sci. Lett. **12**, 133 - 143
- Roeder, R. G. (1976)
Eukaryotic Nuclear RNA Polymerases
in *RNA Polymerase* (Losick, R. & Chamberlin, M., eds.), pp. 285 - 329
Cold Spring Harbor Laboratory
- Samuels, M. & Sharp, P. A. (1986)
Purification and Characterization of a Specific RNA Polymerase II
Transcription Factor
J. Biol. Chem. **261**, 2003 - 2013
- Santoro, C., Mermod, N., Andrews, Ph. C. & Tjian, R. (1988)
A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription
and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs
Nature (Lond.) **334**, 218 - 224
- Sassone-Corsi, P. & Borrelli, E. (1986)
Transcriptional regulation by *trans*-acting factors
Trends Genet. **2**, 215 - 219, No. 8
- Sawadogo, M. & Roeder, R. G. (1985)
Interaction of a Gene-Specific Transcription Factor with the Adenovirus
Major Late Promoter Upstream of the TATA Box Region
Cell **43**, 165 - 175
- Schäffner, A. R. (1988)
Autokatalysierte Affinitätsmarkierung DNA-Abhängiger RNA Polymerasen
*Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-
Universität München*

- Schneider, R., Gander, I., Müller, U., Mertz, R. & Winnacker, E. L. (1986)
A sensitive and rapid gel retention assay for nuclear factor I and other
DNA-binding proteins in crude nuclear extracts
Nucleic Acids Res. **14**, 1303 - 1317, No. 3
- Schumacher, H.-M., Gundlach, H., Fiedler, F. & Zenk, M. H. (1987)
Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell
cultures
Plant Cell Reports **6**, 410 - 413
- Serfling, H., Jasin, M. & Schaffner, W. (1985)
Enhancers and eukaryotic gene transcription
Trends Genet. **1**, 224 - 230, No. 8
- Short, N. J. (1987)
Regulation of Transcription
Nature **326**, 740 - 741
- Sommer, H. & Saedler, H. (1986)
Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*
Mol. Gen. Genet. **202**, 429 - 434
- Spector, T. (1978)
Refinement of the Coomassie Blue Method of Protein Quantitation
Anal. Biochem. **86**, 142 - 146
- Stähler, F. (1977)
Beurteilung und Kontrolle der Qualität von Meßergebnissen
in *Grundlagen der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer H. U. & Gawehn K.,
eds.), pp. 229 - 246, Verlag Chemie, Weinheim und New York
- Suwalsky, M. Traub W. & Shmueli, U. (1969)
An X-ray Study of the Interaction of DNA with Spermine
J. Mol. Biol. **42**, 363 - 373
- Szopa, J. & Wagner, K. G. (1984)
DNA-dependent RNA polymerase II from nuclei of suspension-cultured
tobacco cells
Planta **162**, 132 - 138
- Thomm, M., Madon, J. & Stetter, K. O. (1986)
DNA-Dependent RNA Polymerase of the Three Orders of Methanogens
Biol. Chem. Hoppe-Seyler **367**, 473 - 481

- Thomm, M. & Wich, G. (1988)
An archaeobacterial promoter element for stable RNA genes with homology to TATA box of higher eukaryotes
Nucleic Acids Res. **16**, 151 - 163
- Tipper, D. J. (1973)
Inhibition of Yeast Ribonucleic Acid Polymerases by Thiolutin
J. Bacteriol. **116**, 245 - 256, No. 1
- Tremethick, D. J. & Molloy, P. L. (1986)
High Mobility Group Proteins 1 and 2 Stimulate Transcription *in vitro* by RNA Polymerases II and III
J. Biol. Chem. **261**, 6986 - 6992, No. 15
- van der Linde, P. C. G., Bouman, H., Mennes, A. M. & Libbenga, K. R. (1984)
A soluble auxin-binding protein from cultured tobacco tissues stimulates RNA synthesis *in vitro*
Planta **160**, 102 - 108
- Willmitzer, L. & Wagner, K. G. (1981)
The isolation of nuclei from tissue-cultured plant cells
Exp. Cell Res. **135**, 69 - 77
- Wilson, C. M. (1975)
Plant nucleases
Ann. Rev. Plant Physiol. **26**, 187 - 208
- Wingender, E. & Seifart, K. H. (1987)
Transkription in Eukaryonten - die Rolle von Transkriptionskomplexen und ihren Komponenten
Angew. Chem. **99**, 206 - 215
- Wu, C. (1985)
An exonuclease protection assay reveals heat-shock element and TATA box DNA-binding proteins in crude nuclear extracts
Nature (Lond.) **317**, 84 - 87
- Yannish-Perron, C., Viera, J. & Messing, J. (1985)
Improved M13 Phage Cloning and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13mp18 and pUC19 Vectors
Gene **33**, 103 - 119
- Zillig, W., Palm, P., Reiter, W.-S., Gropp, F., Pühler, G. & Klenk, H.-P. (1988)
Comparative evaluation of gene expression in archaeobacteria
Eur. J. Biochem. **173**, 473 - 482

Abkürzungen

DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
NET	NaCl (0,15 M), EDTA (0,1 mM), Tris (20 mM, pH 8,0)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNase	Ribonuclease
TBE	Tris (0,09 M), Borsäure (0,09 M), EDTA (2 mM)
TE	Tris (10 mM, pH 8,0), EDTA (1mM)

Lebenslauf

Familienname: BOSL

Vornamen: Raphael Konrad

Geboren am 02.06.1960 in Nürnberg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: rk

Familienstand: verheiratet seit 01.06.1988

1966 - 71 Volksschule in Ottobrunn und Neubiberg

1971 - 80 Mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasien in Ottobrunn und
in Neubiberg

27.06.1980 Abitur

1980 - 86 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

24.02.1986 Chemie-Diplom

Diplomarbeit vom April 1985 bis Februar 1986 am Biochemischen
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität bei Prof. Dr. G. Hartmann
mit dem Thema: "Kinetik der Dinukleotidsynthese an der RNA Poly-
merase B(II) aus Weizenkeimen"

seit März 1986 Doktorarbeit am Biochemischen Institut bei
Prof. Dr. G. Hartmann

seit Oktober 1986 Graduiertenförderung der Hanns-Seidel-Stiftung

